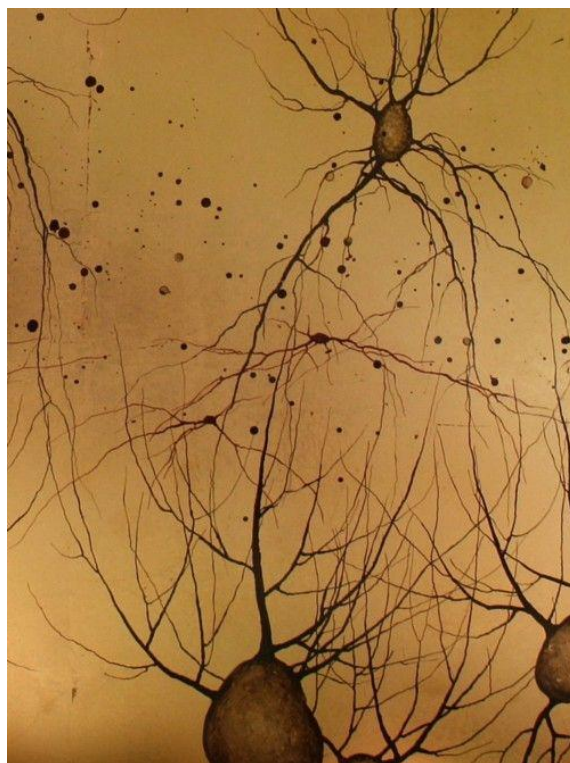




ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΜΟΥ

Ντάλλα Χριστίνα, Βιολόγος Ε.Κ.Π.Α.

Επιβλέπουσα: Δ. Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εθνικού και Καποδιστριακού
Πανεπιστημίου Αθηνών, Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας

ΑΘΗΝΑ, 2018

Στον ανιψιό μου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Νευροεκφυλισμός.	11
1.1.1 Μοριακοί Μηχανισμοί Νευροεκφυλισμού.	12
1.2 Νευροεκφυλιστικές Νόσοι.	18
1.2.1 Νόσος του Alzheimer' s (Alzheimer Disease- AD).....	18
1.2.1.1 Νευροπαθολογία της νόσου AD	18
1.2.1.2 Μοριακή και Γενετική Βάση της AD.....	20
1.2.1.2.1 Πρόδρομη Πρωτεΐνη του Αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein- APP).	20
1.2.1.2.2 Η Πρωτεΐνη Ταυ.....	25
1.2.1.2.3 Η Απολιποπρωτεΐνη Ε (ApoE).	26
1.2.1.2.4 Πρεσενιλίνες	26
1.2.2 Νόσος του Parkinson (Parkinson's Disease- PD).....	29
1.2.2.1 Νευροπαθολογία της PD.	29
1.2.2.2 Μοριακή και Γενετική Βάση της PD.....	30
1.2.2.2.1 Η α- συνουκλεΐνη (α- Synuclein- ASYN).	32
1.3 Η αποκαρβοξυλάση της L-DOPA (L- DOPA decarboxylase- DDC).	36
1.3.1 Η Δομή της DDC.	39
1.3.2 Παράγοντες που ρυθμίζουν την ενεργότητα της DDC.....	41
1.3.3 Το γονίδιο της DDC.	43
1.3.3.1 Η Ρύθμιση της Έκφρασης του Ανθρώπινου Γονιδίου της DDC σε Μεταγραφικό και Μετα-μεταγραφικό Επίπεδο.....	44
1.3.3.2 Η Ρύθμιση της DDC σε Μετα- μεταφραστικό επίπεδο.....	47
1.3.4 Η Τοπολογία της DDC.....	48
1.3.4.1 Η Παρουσία της DDC στο ΚΝΣ.	49
1.3.4.2 Η Κατανομή της DDC στη Γλοία.	49
1.3.4.3 Η Κατανομή της DDC σε Περιφερικούς Ιστούς.....	50
1.3.4.4 Η Υποκυτταρική Τοπολογία της DDC.....	51
1.3.5 Η Σχέση της DDC με τη PD.	53

1.3.6 Σχέση της DDC με τη AD.....	55
1.4 Βιολογική Σημασία Ντοπαμίνης (Dopamine- DA) και Ντοπαμινεργικού Συστήματος στον Εγκέφαλο.	56
1.4.1 DA και Οξειδωτικό στρες.	57
1.4.2 Η Αλληλεπίδραση DA με την ASYN.	61
1.4.3 Σχέση DA και AD.....	64
1.5 AD vs. PD	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	73
3.1 Υλικά.....	73
3.2 Διαλύματα.	74
3.3 Κυτταρικές Σειρές.	77
3.4 Καλλιέργεια Ευκαρυωτικών Κυττάρων <i>in vitro</i>	78
3.4.1 Παρασκευή Θρεπτικού Υλικού.	78
3.4.2 Απόψυξη Κυττάρων από το Υγρό Άζωτο.	79
3.4.3 Διαμοιρασμός Κυττάρων (split) – Ανακαλλιέργεια.	79
3.4.4 Εξωγενής Χορήγηση παραγόντων (DA, carbidopa, STS).....	80
3.4.5 Κατάψυξη και Φύλαξη Κυττάρων στους -80 °C στο Υγρό Άζωτο.	81
3.5 Ανοσοσύπωμα κατά Western (Western Blot).	81
3.5.1 Συλλογή κυττάρων- Απομόνωση πρωτεϊνών.	82
3.5.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Πρωτεϊνών με τη Μέθοδο Bradford.....	82
3.5.3 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών με SDS- PAGE σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης.	84
3.5.4 Ανάλυση Πρωτεϊνών με Ανοσοσύπωση κατά Western (Western Blot).	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
4.1 Μελέτη της Επίδρασης της DDC και των Ισομορφών της στην Έκφραση, στη Δημιουργία Υψηλομοριακών APP Συμπλόκων και στην Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP.....	87
4.1.1 Μελέτη της Επίδρασης της DDC και των Ισομορφών της στην Αμυλοειδογενή Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP.	88
4.1.2 Μελέτη της Επίδρασης της Έκφρασης της DDC και των Συντετμημένων Ισομορφών αυτής στην Έκφραση της Πλήρους μήκους APP και στην Καρβοξυτελική Πρωτεολυτική Επεξεργασία της.	89
4.1.3 Μελέτη της επίδρασης της DDC και των Ισομορφών της στη Δημιουργία Υψηλομοριακών Συμπλόκων της APP.	90

4.2 Μελέτη της Επίδρασης της DA στην Έκφραση και Πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις Κυτταρικές Σειρές που Εκφράζουν την Πλήρους Μήκους DDC και τις Εναλλακτικές Ισομορφές Αυτής.....	91
4.2.1 Μελέτη της Επίδρασης της DA (25 και 75 μ M) στη Δημιουργία Υψηλομοριακών APP Συμπλόκων, σε Κυτταρικές Σειρές CHO και CHO/ DDC.	91
4.2.2 Μελέτη της Επίδρασης της DA (25 και 75 μ M) στην Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP, σε Κυτταρικές Σειρές CHO και CHO/ DDC.....	92
4.2.3 Μελέτη της επίδρασης της DA (25 και 75 μ M) στη δημιουργία υψηλομοριακών APP συμπλόκων, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC-3.....	93
4.2.4 Μελέτη της Επίδρασης της DA (25 και 75 μ M) στην Πρωτεολυτική επεξεργασία της APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC-3.	94
4.2.5 Μελέτη της επίδρασης της DA (25 και 75 μ M) στη δημιουργία υψηλομοριακών APP συμπλόκων, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ Alt- DDC.	95
4.3 Μελέτη της Επίδρασης της Carbidopa στην Έκφραση και στην Πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις Κυτταρικές Σειρές που Εκφράζουν την Πλήρους Μήκους DDC και τις Εναλλακτικές Ισομορφές Αυτής.	96
4.3.1 Μελέτη της επίδρασης της carbidopa (20 και 100 μ M) στη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC.	96
4.3.2 Μελέτη της επίδρασης της carbidopa (20 και 100 μ M) στη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC-3.	97
4.3.3 Μελέτη της επίδρασης της carbidopa (20 και 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP, σε κυτταρικές σειρές CHO, CHO/ DDC, CHO/ DDC-3 και CHO/ Alt- DDC.	97
4.4 Μελέτη της Επίδρασης της Σταυροσπορίνης (STS) στην Έκφραση και στην Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP στις Κυτταρικές Σειρές που Εκφράζουν την Πλήρους Μήκους DDC και τις Εναλλακτικές Ισομορφές Αυτής.....	99
4.5 Μελέτη της Επίδρασης της Αννεξίνης V στην Έκφραση και στην Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP στις Κυτταρικές Σειρές που Εκφράζουν την Πλήρους Μήκους DDC και τις Εναλλακτικές Ισομορφές Αυτής.	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	114

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2016- 2017 στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Με την ολοκλήρωση της εργασίας μου, θα ήθελα να απευθύνω ένα βαθύ και ολόψυχο ευχαριστώ σε όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτή την επίπονη προσπάθεια και με βοήθησαν να τη φέρω εις πέρας.

Κατ'αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διδώ Βασιλακοπούλου. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου προσέφερε κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους, για την υλικοτεχνική υποστήριξη, χωρίς την οποία δε θα είχαν προκύψει τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις της κατά τη συγγραφή της. Δεν μπορώ να παραβλέψω το ενδιαφέρον και την ηθική υποστήριξή της σε ορισμένες δύσκολες στιγμές, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, που αναπόφευκτα παρουσιάζονται κατά τη διάρκεια ενός μεταπτυχιακού, χωρίς τα οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Διαμάντη Σίδερη για τη συμπαράσταση, το ενδιαφέρον και την άμεση ανταπόκριση κάθε φορά που χρειαζόμουν τη βοήθειά του, καθώς και σε όλους τους Καθηγητές-μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και διπλωματικούς φοιτητές που πέρασαν από την Ερευνητική Μονάδα Ι και μοιραστήκαμε κοινές όμορφες στιγμές και ανησυχίες, ιδιαίτερα το Μανώλη Βουράκη, τον Καλαντζή Βαγγέλη, τη Στέφη Κατερίνα, την Ευδοκία Μάστορα και το Δημήτρη Αρβανίτη. Επίσης, ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους και τα μέλη του Τομέα για τη συμπαράσταση και συνεργασία τους, ιδιαίτερα το Νίκο Αρβανίτη.

Τέλος, απέραντη ευγνωμοσύνη και θερμό ευχαριστώ χρωστώ στα μέλη της οικογένειάς μου· στους γονείς μου Γιάννη και Ελένη, στον αδελφό μου Βασίλη και φυσικά σε όλους μου τους φίλους, καθώς η αγάπη τους, η ηθική και η οικονομική υποστήριξή τους με βοήθησαν να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Alzheimer (AD) και η νόσος του Parkinson (PD) είναι κοινές νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της AD περιλαμβάνουν τις εξκυττάρειες εναποθέσεις πεπτιδίου του αμυλοειδούς (Αβ) και τους νευροϊνιδιακούς κόμβους (NFTs). Το πεπτίδιο του αμυλοειδούς, αποτελεί προϊόν πρωτεολυτικής επεξεργασίας της Πρόδρομης Πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Η πλήρους μήκους APP είναι μία διαμεμβρανική τύπου I πολυπεπτιδική πρωτεΐνη, που καλύπτει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα με μια ακολουθία περίπου 25 αμινοξέων. Η πρωτεολυτική επεξεργασία της APP περιλαμβάνει τη δράση των β- και γ- εκκριτασών. Μέσω της δραστηριότητάς τους, παράγεται το πεπτίδιο του αμυλοειδούς, ενώ η α-εκκριτάση αποτρέπει την παραγωγή Αβ με πέψη της APP εντός της περιοχής του αμυλοειδούς. Τα σωμάτια Lewy, είναι ένα ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό της PD. Είναι ενδοκυττάρια έγκλειστα, που προέρχονται από τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων και αποτελούνται κυρίως από α-συνουκλείνη (ASYN). Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση (DDC) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αποκαρβοξυλίωση της L-3,4-διϋδροξυφαινυλαλανίνης (L-Dopa) σε ντοπαμίνη (DA). Τα εναλλακτικά γεγονότα συρραφής οδηγούν στην παραγωγή πολλαπλών ανθρώπινων DDC ισομορφών. Η DDC έχει εμπλακεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως πολλαπλές νεοπλασίες και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Αυξανόμενο πλήθος ερευνών δείχνουν την ύπαρξη κοινών μοριακών μηχανισμών στην ανάπτυξη της AD και της PD. Οι μεταβολές στο ντοπαμινεργικό σύστημα είναι σημαντικές στην παθογένεση της PD. Τελευταία, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την εμπλοκή της DA και στην AD. Συγκεκριμένα, έρευνες αναφέρουν ότι η ρύθμιση της παραγωγής της DA διαδραματίζει τεράστιο ρόλο στα συμπτώματα της γνωστικής εξασθένησης της AD και ενδεχομένως μεταβάλλει την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της εργασίας μας ήταν να μελετήσουμε την επίδραση της έκφρασης της ανθρώπινης DDC και των ισομορφών αυτής, στην έκφραση της πλήρους μήκους APP, καθώς και στον μεταβολισμό της. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ που εκφράζουν σταθερά την πλήρους μήκους DDC, καθώς και τις ισομορφές DDC-3 και Alt-DDC, με ή χωρίς τη χορήγηση εξωγενών παραγόντων (DA, carbidopa, STS). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν, ότι η έκφραση της πλήρους μήκους APP τροποποιείται από την DDC και τις ισομορφές της. Περαιτέρω, η πρωτεολυτική επεξεργασία της APP φαίνεται να μεταβάλλεται δραματικά, παρουσία της πλήρους μήκους DDC και των συντετμημένων ισομορφών. Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο των ισομορφών DDC στην αμυλοειδογενή και καρβοξυτελική επεξεργασία της APP, στη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων αυτής, καθώς και στην έκφραση της πλήρους μήκους APP και

προτείνουν έναν νέο ρόλο του ενζύμου βιοσύνθεσης της DA στην AD. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας συνηγορούν και προσθέτουν νέα δεδομένα στην ύπαρξη κοινών μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών στην παθογένεση νευροεκφυλιστικών νόσων.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- AD: Alzheimer's disease
- APP: Amyloid Precursor Protein, πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς
- APS: ammonium persulphate, υπερθειϊκό αμμώνιο
- ASYN: α - synuclein
- AVs: αδενοϊός (Adenovirus)
- BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt, 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-φωσφορικό μετά της τολουιδίνης άλας
- BSA: bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός
- Ca-CM PK II: calcium-calmodulin-dependent protein kinase II, πρωτεϊνική κινάση II εξαρτώμενη από ασβέστιο-καλμοδουλίνη
- cAMP: cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
- cDNA: complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
- carbidopa: α -methyl-dopahydrazine, καρβιντόπα, α -μεθυλ-dopa υδραζίνη
- DA: 3,4-dihydroxy phenethylamine, 3-hydroxytyramine, 2-(3,4-διυδροξυ- φαινυλ) αιθυλαμίνη, ντοπαμίνη
- DBH: dopamine β -hydroxylase, β -υδροξυλάση της ντοπαμίνης 12
- DDC: L-Dopa decarboxylase, L-Dopa αποκαρβοξυλάση
- DDC442: L-Dopa αποκαρβοξυλάση που αποτελείται από 442 αμινοξέα
- DDC480: L-Dopa αποκαρβοξυλάση που αποτελείται από 480 αμινοξέα
- DMF: dimethylformamide, διμεθυλοφορμαμίδιο
- DMSO: dimethyl sulfoxide
- DNA: δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- L-5-HTP: L-5-hydroxytryptophan, L-5-υδροξυτρυπτοφάνη
- L-Dopa: L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine, L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνη
- mRNA: messenger RNA, μήνυμα RNA
- NBT: nitro blue tetrazolium chloride, 2H-(Tetrazolium,3,3'- (3,3'-dimethoxy (1,1'- biphenyl)- 4,4'- diyl) bis (4-nitrophenyl)-5- (phenyl-, dichloride), 2,2'-δι-νιτροφαινυλ- 5,5'-διφαινυλ-3,3'-(3,3'-διμεθοξυ-4,4'διφαινυλεν-χλωριούχο) τετραζόλιο
- NPAGE: native PAGE, ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες
- PBS: phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
- PD: Parkinson's disease
- PKA: cAMP-dependent protein kinase, πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από cAMP
- PKC: protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C
- PLP: 5-pyridoxal phosphate, 5-φωσφορική πυριδοξάλη
- PNMT: phenylethanolamine N-methyltransferase, φαινυλαιθανολαμιν-N-μέθυλο-τρανφεράση
- ROS: ενεργές μορφές οξυγόνου, (reactive oxygen species)
- RT: θερμοκρασία δωματίου, (room temperature)
- rpm: revolutions per minute, στροφές ανά λεπτό
- SDS: sodium dodecyl sulfate, θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
- TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylene- diamine, N,N,N',N'-τετραμεθυλ- αμινομεθάνιο
- Tris: Tris(hydroxymethyl) aminomethane, τρις- (υδροξυμεθυλο)- αμινομεθάνιο
- Tween-20: polyoxyethylen- sorbitan- monolaurate, πολυοξυαιθυλεν- σορβιτο- μονολαουρικό
- UTR: untranslated region, μη μεταφραζόμενη περιοχή
- w/v: συγκέντρωση επί τοις εκατό βάρος κατ' όγκο, (g διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύτη)

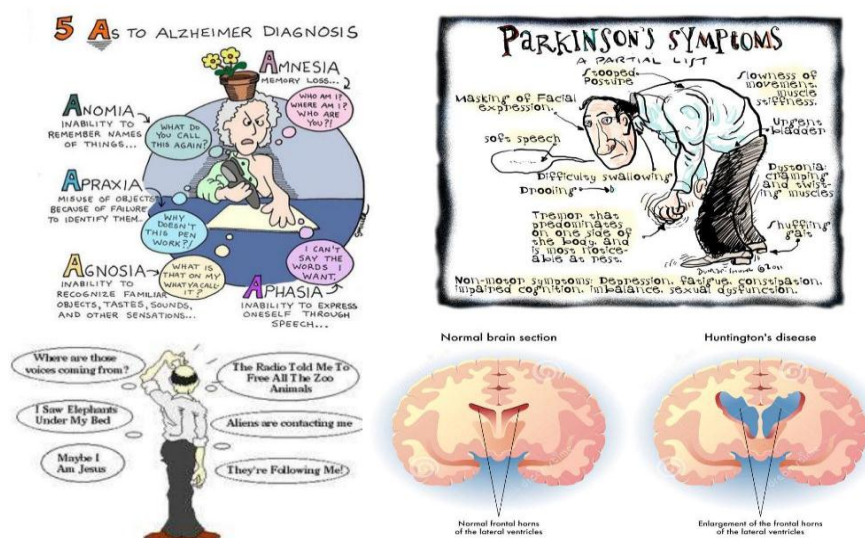
- ν/ν: συγκέντρωση επί τοις εκατό όγκο κατ' όγκο, (ml διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύτη)
- UPS: σύστημα αποδόμησης ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος, (Ubiquitin- proteasome System)
- ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- 5-HT: 5-hydroxy-tryptamine, 5- υδροξυ- τρυπταμίνη ή serotonin, σεροτονίνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νευροεκφυλισμός.

Νευροεκφυλισμός ορίζεται ως η επιλεκτική και προοδευτική απώλεια δομής ή/και λειτουργίας των νευρώνων. Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι είναι μια ετερογενής ομάδα περίπλοκων διαταραχών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι νόσοι του Parkinson (PD), του Alzheimer (AD), του Huntington (HD), η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis- ALS), η σπειροεγκεφαλική αταξία, ακόμα και η κατάθλιψη, ασθένειες ανίατες στην πλειοψηφία τους που έχουν ως αποτέλεσμα τον προοδευτικό εκφυλισμό ή και θάνατο των νευρικών κυττάρων του περιφερικού και του ΚΝΣ [1]. Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες αποτελούν σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Αυτές οι ηλικιο-εξαρτώμενες διαταραχές επικρατούν όλο και περισσότερο σήμερα, λόγω της αύξησης του προσδόκιμου ζωής τα τελευταία χρόνια [2]. Όλο και νεότερα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν πολλές ομοιότητες που συνδέουν αυτές τις ασθένειες μεταξύ τους σε βιοχημικό, μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. Η μελέτη αυτών των ομοιοτήτων προσφέρει νέες οδούς για θεραπευτικές στρατηγικές που θα μπορούσαν να έχουν επίδραση στη βελτίωση πολλών ασθενειών [3, 4].

Βάσει των κλινικών συμπτωμάτων, των εγκεφαλικών ιστοπαθολογικών ευρημάτων, των κυτταρικών τύπων που έχουν προσβληθεί, των μοριακών και βιοχημικών χαρακτηριστικών, συντελείται η κατηγοριοποίηση των νόσων [5]. Βέβαια, κατά την κλασική ταξινόμηση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών παρουσιάζονται προβλήματα, διότι αφενός υπάρχουν πολλαπλών νευροεκφυλιστικές ασθένειες, στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κλινικών συμπτωμάτων των ασθενειών. Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι έχουν άγνωστο χρόνο προ- επώασης και απαιτείται η πλήρης εξέλιξή τους για να δώσουν μια πιο σαφή τοπογραφική και κλινική εικόνα. Ειδικότερα, προσεγγίσεις μοριακής βιολογίας και γενετικής, οδήγησαν στην ταξινόμηση των ασθενειών αυτών. Οι παθήσεις αυτές καταστάσεις ταξινομούνται μοριακά σε «tauopathies» (AD, φλοιοβασική εκφύλιση), όπου εμπλέκεται η πρωτεΐνη «tau» των μικροσωληνίσκων [6] και σε «synucleinopathies» (PD, πολλαπλή ατροφία, κ.α.), με την α-συνουκλείνη (ASYN) να παίζει τον κυρίαρχο ρόλο [7].



Εικόνα 1.1: Παραδείγματα νευροεκφυλιστικών νόσων

1.1.1 Μοριακοί Μηχανισμοί Νευροεκφυλισμού.

Το μοριακό υπόβαθρο των νευροεκφυλιστικών ασθενειών είναι αντικείμενο εντατικής μελέτης παγκοσμίως. Η μεγαλύτερη πρόκληση που αντιμετωπίζουν οι ερευνητές είναι η ταξινόμηση των πρωταρχικών αιτιολογιών από τα μοριακά φαινοτυπικά αποτελέσματα. Σπάνιες, κληρονομικές μεταλλάξεις που προκαλούν αυτές τις διαταραχές, έχουν δώσει σημαντικά στοιχεία για τα μοριακά δίκτυα που συμμετέχουν στην παθογένεση των νόσων αυτών [8]. Πρόσφατες πειραματικές προσεγγίσεις έχουν προσφέρει εκ νέου κατηγοριοποιήσεις των ασθενειών αυτών με βάση τους μηχανισμούς που διέπουν τη δημιουργία του, αναπτύσσοντας και υποβοηθώντας τη διερεύνηση τη στρατηγική αντιμετώπισής τους. [1]. Ο συνδυασμός μοριακών, κυτταρικών ή η υποκυτταρικών ευρημάτων όπως η συσσώρευση μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών, ο σχηματισμός πρωτοϊνιδίων, η δυσλειτουργία του συστήματος ουβικιτίνης- πρωτεασώματος, η φλεγμονώδης απόκριση, το οξειδωτικό και νιτρικό στρες, η μιτοχονδριακή βλάβη, η συναπτική βλάβη, η αλλοιωμένη ομοιόσταση μετάλλου, καθώς και η αποτυχημένη αξονική και δενδριτική μεταβίβαση σήματος, οδηγούν σε προοδευτικά αργές νευροεκφυλιστικές διαταραχές [8].

Ένα πολύ μικρό ποσοστό των περιπτώσεων των ασθενειών έχει οικογενή χαρακτήρα. Μια σειρά από μεταλλάξεις σε γονίδια έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων (βλέπε Πίνακα 1.1.1.1). Για παράδειγμα, στην HD και στη σπειροεγκεφαλική αταξία, κοινός παρανομαστής των νόσων αυτών είναι η επανάληψη νουκλεοτιδικών τριπλετών CAG. Υπογραμμίζεται πως οι οικογενείς μορφές

των νόσων, αποτελούν μόνο ~5% των περιπτώσεων, σε αντίθεση με το ~95% των σποραδικών μορφών. Η αιτιολογία της σποραδικής μορφής των νόσων συμπεριλαμβάνει κυρίως περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αρχικά, πολλές νευροεκφυλιστικές νόσοι οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες εντοπίζονται σε σχετικά αλλά και σε μη σχετικά με τη νόσο γονίδια. Όμως, το πρόβλημα της εμφάνισης των νευροεκφυλιστικών ασθενειών είναι αρκετά πολύπλοκο και δεν μπορεί να επιλυθεί με απενεργοποίηση ή υπερέκφραση ενός γονιδίου και μόνο, καθώς εμπλέκονται πολλαπλά γονίδια. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δημιουργίας των συγκεκριμένων ασθενειών παραμένουν εν γένει άγνωστοι [9].

Table 1
Overview of established neurodegenerative disease genes

Disease	Gene (first ref.)	Protein	Location	Inheritance	Relevance to pathogenesis
AD	<i>APP</i> (15)	Aβ precursor protein	21q21	Dominant	Altered Aβ production (Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀ ratio ↑) and aggregation
AD	<i>APOE</i> (21, 22)	Apolipoprotein E	19q13	Risk factor	Unknown (Aβ aggregation? lipid metabolism?)
AD	<i>PSEN1</i> (16)	Presenilin 1	14q24	Dominant	Altered Aβ production (Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀ ratio ↑)
AD	<i>PSEN2</i> (17, 18)	Presenilin 2	1q31	Dominant	Altered Aβ production (Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀ ratio ↑)
PD	<i>SNCA</i> (32)	α-Synuclein	4q21	Dominant	Neurotoxicity by aggregation of α-synuclein (?)
PD	<i>PRKN</i> (33)	Parkin	6q25	Recessive	Impaired protein degradation via proteasome
PD	<i>DJ1</i> (34)	DJ-1	1p36	Recessive	Impaired oxidative stress response (?)
PD	<i>PINK1</i> (35)	PTEN induced putative kinase 1	1p36	Recessive	Mitochondrial dysfunction (?)
PD	<i>LRKK2</i> (36, 37)	Leucine-rich repeat kinase 2; dardarin	12q12	Dominant	Unknown
FTD	<i>MAPT</i> (53)	Microtubule-associated protein tau	17q21	Dominant	Altered tau-production (4R/3R ratio ↑), and/or altered binding to microtubules
ALS	<i>SOD1</i> (63)	Superoxide dismutase 1	21q22	Dominant and recessive	Protein misfolding/aggregation and/or impaired oxidative stress response (?)
ALS	<i>ALS2</i> (68, 69)	Alsin	2q33	Recessive	Impaired neuroprotection (?)
HD	<i>HD</i> (76)	Huntingtin	4p16	Dominant	Unknown
Prion	<i>PRNP</i> (84)	Prion protein	20p13	Dominant and risk	Transformation of PrP ^C into PrP ^{Sc}

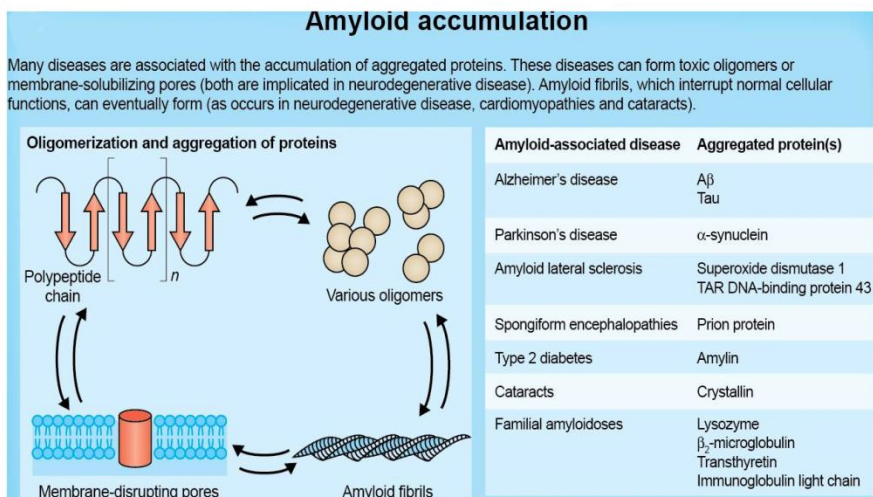
Diseases are listed in the order in which they are discussed in the text. Prion, familial prion disease (see text for more details); first ref., publication showing first evidence of disease involvement; ↑, increase; 4R, 4-repeat; PrP^C, normal form of PrP; PrP^{Sc}, disease-associated (scrapie) form of PrP. For an up-to-date overview on AD association results, see ref. 13; for mutation findings in AD and FTD, see ref. 19; for mutations in ALS, see ref. 82.

Πίνακας 1.1.1.1: Γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων [10]

Κατά τους μηχανισμούς γένεσης του νευροεκφυλισμού, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την παρουσία πρωτεϊνών με αλλοιωμένες τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους. Οι πρωτεΐνες αυτές εναποτίθενται και συσσωρεύονται ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Ως εκ τούτου, κοινό γνώρισμα του νευροεκφυλισμού είναι η τροποποίηση της πτύχωσης ορισμένων πρωτεϊνικών μορίων και η σταδιακή συσσώρευσή τους. Για παράδειγμα, η α- συνουκλεΐνη (ASYN) εναποτίθενται ενδοκυττάρια, συμμετέχοντας στη δημιουργία των ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών της PD, τα σωμάτια Lewy (Lewy bodies). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα, τα οποία υποστηρίζουν τον συνεντοπισμό της ASYN σε πλάκες του αμυλοειδούς στην AD. Στις μη ορθά πτυχωμένες πρωτεΐνες συγκαταλέγεται και η τροποποιημένη μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεΐνη tau, κύριο συστατικό των νευροϊνιδιακών κόμβων, το Αβ στις πλάκες αμυλοειδούς σε εγκεφάλους που έχουν πληγεί από την AD, καθώς και η πρωτεΐνη PrP (Prion Protein) στις μεταδιδόμενες σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες [11].

Η τροποποίηση της δομής των πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην παθογένεση των νευροεκφυλιστικών νόσων, αποκτούν τροποποιημένες ιδιότητες και μοριακή «συμπεριφορά», έχουν τοξική δράση και ως εκ τούτου επάγουν την εκφύλιση των νευρώνων. Βάσει των ανωτέρων και με υπόβαθρο των αποτελεσμάτων, οι παθήσεις αυτές κατατάσσονται σε πρωτεϊνοπάθειες [12]. Η συσσώρευση των τοξικών (για το κύτταρο) μη πτυχωμένων πρωτεϊνικών μορίων είναι το υπόστρωμα που υποβοηθά την επαγωγή εκφυλισμού των νευρώνων και θεωρείται ως μία πολυσταδιακή διαδικασία. Σε γενικές γραμμές, η προτεινόμενη διαδικασία της εν λόγω συσσώρευσης ακολουθεί τα εξής στάδια:

1. Η μη ορθή πτύχωση των σχετικών πρωτεϊνικών μορίων και των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν, μπορεί να οφείλεται σε μετάλλαξη των σχετικών γονιδίων.
2. Η τροποποιημένη πτύχωση οδηγεί στη δημιουργία ολιγομερών.
3. Επιπρόσθετος πολυμερισμός μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό τοξικών πρωτοϊνιδίων.
4. Τα εν λόγω τοξικά πρωτοϊνίδια έχουν τη δυνατότητα περαιτέρω συσσώρευσης, καταλήγοντας στη δημιουργία μη φυσιολογικών δομών, οι οποίες είναι τα κύρια συστατικά εναποθέσεων, προωθώντας τη δημιουργία ενδονευρικών εγκλείστων ή εξωκυττάρριων πλακών [11].



Εικόνα 1.1.1.1: Μηχανισμός συσσώρευσης μη πτυχωμένων πρωτεϊνών [11]

Όπως έχει αναφερθεί, η δημιουργία των παραπάνω συσσωματωμάτων, επιβαρύνουν την επιβίωση του κυττάρου. Για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, των ελαττωματικών και των μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών, που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το κύτταρο, λόγω αδυναμίας επαναπύχωσής τους, χρησιμοποιούνται δύο μεθόδους: α) Το σύστημα της ουβικιτίνης- πρωτεασώματος και β) το μονοπάτι αυτοφαγίας- λυσοσώματος. Σε κατάσταση νευροεκφυλισμού έχει παρατηρηθεί η μειωμένη ενεργότητα του συστήματος ουβικιτίνης-

πρωτεασώματος. Επίσης, έχει αναφερθεί μία μεταλλαγή σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την ένζυμο UCHL1, η οποία εμπλέκεται στη διαδικασία της ουβικιτινίωσης. Η δεύτερη μέθοδος αποικοδόμησης πρωτεϊνών είναι το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος, μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ιδιαίτερα σημαντική για την επιβίωση των νευρώνων, κατά την οποία κατεστραμμένα οργανίδια και αλλοιωμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται. Υπερβολική ή ελλιπής αυτοφαγία, οδηγεί σε νευροεκφυλισμό [13]. Η αυτοφαγία χωρίζεται σε μακροαυτοφαγία και αυτοφαγία, διαμεσολαβείται δε από πρωτεΐνες συνοδούς [14]. Επίσης, η καταστροφή μεμβρανών και κυτταρικών οργανιδίων μπορεί να οδηγήσει σε εκδήλωση νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Αναφορά η της ASYN, η οποία προκαλεί κάμψη της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας τελικά στον κυτταρικό θάνατο, σχηματίζοντας λιποπρωτεϊνικά νανοσωματίδια, όμοια με τις απολιποπρωτεΐνες [15]. Το κύτταρο διατηρεί υγιή μιτοχόνδρια, αποικοδομώντας τα ελαττωματικά μέσω της διαδικασίας της μιτοφαγίας. Η ελαττωματική μιτοφαγία έχει σχετιστεί με την PD, μέσω ενός ενζύμου (USP30), το οποίο εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Το USP30, έχει βρεθεί να ανταγωνίζεται τη λιγάση Parkin και την πρωτεϊνική κινάση PINK1, οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την PD [16].

Η ενδογενής μιτοχονδριακή αποπτωτική οδός, θεωρείται ο πιο κοινός τρόπος κυτταρικού θανάτου στον νευροεκφυλισμό. Η ενεργοποίηση της οδού αυτής πραγματοποιείται μέσω της κασπάσης-9. Η κασπάση 9, ρυθμίζει με τη σειρά της την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο. Σημειώνεται ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου αποτελούν φυσιολογικά υποπροϊόντα της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Η υπερπαραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, δηλαδή η επαγωγή συνθηκών οξειδωτικού στρες, διαδραματίζει τον κύριο ρόλο στην παθογένεση όλων των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως στη AD, στη PD, στη HD και στη ALS [17, 18]. Ως γνωστόν, οι αποπτωτικοί μηχανισμοί συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου. Οι μηχανισμοί αυτοί, ρυθμίζουν τον αριθμό και τον τύπο των κυττάρων σε φυσιολογικές και μη συνθήκες (κατάσταση στρες). Παρ' όλα αυτά, οι αποπτωτικοί μηχανισμοί, μπορεί να αποτελούν και ένα εναλλακτικό μονοπάτι κυτταρικού θανάτου. Η αυτοφαγία και η απόπτωση μπορούν να ενεργοποιηθούν από κοινούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς κατά τους οποίους τα κύτταρα αποδέκτες τροποποιούνται μέσω των αποκρίσεων με αλληλοαποκλειόμενο τρόπο. Για τους παραπάνω λόγους, η ρύθμιση της ισορροπίας των δύο συγκεκριμένων βιοχημικών μονοπατιών, θα μπορέσει να αποτελέσει μια μέλλουσα θεραπευτική προσέγγιση [19, 20].

Ο σημαντικότερος παράγοντας επικινδυνότητας για εμφάνιση σποραδικής μορφής νευροεκφυλισμού είναι η γήρανση. Γονίδια τα οποία διαδραματίζουν ρόλο σε αποκρίσεις οξειδωτικού στρες και επιδιόρθωσης βλάβης του DNA αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα γονιδίων που εμπλέκονται

στη γήρανση. Επίσης και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σχετίζεται με τη διαδικασία της γήρανσης, καθώς και με τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές μέσω της συσσώρευσης μιτοχονδριακών μεταλλάξεων και της δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως προαναφέρθηκε. Με τη διαδικασία της γήρανσης, η εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία, η οποία εξαρτάται από την αυτοφαγία, φθίνει κατά τον νευροεκφυλισμό. Επιπροσθέτως, ορισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το PI3- K, Akt και mTOR είναι στενά συνδεδεμένα με την κυτταρική γήρανση και ηλικιο- εξαρτώμενες διαταραχές. Ο mTOR λειτουργεί ως αναστολέας της αυτοφαγίας και ανιχνεύεται στον εγκέφαλο κατά τη διαδικασία της γήρανσης. Η σηματοδότηση μέσω των PI3- K, Akt και mTOR επηρεάζει έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαδικασιών, οι οποίες ρυθμίζουν νευρωνικές λειτουργίες, όπως τη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης, τη ρύθμιση της αυτοφαγίας, τον έλεγχο της μιτοχονδριακής οξειδωτικής λειτουργίας, καθώς και τη διαμόρφωση της διάρκειας ζωής και της γήρανσης. Ως εκ τούτου, τα σηματοδοτικά αυτά μόρια αποτελούν θεραπευτικούς στόχους, διότι μπορούν να αποτελέσουν ουσιώδεις παράγοντες νευροπροστασίας [21].

Εναλλακτικά, η εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων νευροεκφυλισμού, πιθανώς σχετίζεται με θεμελιώδεις διαταραχές της νευρογένεσης και της νευρωνικής ανάπτυξης. Αναφορικά είναι γνωστό, πως δημιουργία νευρώνων στον ώριμο εγκέφαλο, τροποποιείται κατά την νευροεκφυλιστική διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από σηματοδοτικά μονοπάτια με εμπλεκόμενα μόρια όπως Wnt, Notch, Hedgehog, αυξητικούς και νευροτροφικούς παράγοντες, μορφογενετικές πρωτεΐνες οστών, νευροδιαβιβαστές, μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις [22]. Η εμφάνιση νευροφλεγμονής είναι άλλος ένα παράγοντας που σχετίζεται με τη δημιουργία του νευροεκφυλισμού σε διάφορες ασθένειες όπως η AD, η PD, η HD και η ALS, όπου εμπλέκονται σηματοδοτικά μονοπάτια (MAPK, NF- κB, PPAR- γ) και κυτοκίνες (TNF- α, Interleukin-1, 6 και 10, TGF- β). Υπάρχει αξιοσημείωτη σύγκλιση μεταξύ των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την ανίχνευση, μεταγωγή και ενίσχυση φλεγμονωδών αποκρίσεων που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή νευροτοξικών διαμεσολαβητών [23]. Έως τις αρχές του 1990, κυριαρχούσε η άποψη πως ο εγκέφαλος βρισκόταν σε προνομιακή θέση, εξαιτίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ο οποίος εμποδίζει τη διέλευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλων χυμικών παραγόντων, και εξαιτίας της αδυναμίας του εγκεφάλου να προκαλέσει έμφυτη ανοσο-απόκριση. Κατά τα τελευταία 20 χρόνια, η υπόθεση αυτή έχει ανατραπεί πλήρως. Σήμερα πιστεύεται, πως ο εγκεφαλικός ιστός έχει μία πολύπλοκη και ευέλικτη ικανότητα, να μεταβάλλει τα έμφυτα παρακρινή συστήματά του, χρησιμοποιώντας φλεγμονώδεις παράγοντες, οι οποίοι παράγονται και ρυθμίζονται αυτόνομα [24]. Η ρύθμιση της νευροανοσο- απόκρισης είναι ένα φαινόμενο, το οποίο βασίζεται σε περιβαλλοντικά

ερεθίσματα ενός διαρκώς μεταβαλλόμενου υποβάθρου [25]. Άτομα τα οποία υποβάλλονται σε επίμονο στρες, εμφανίζουν μη φυσιολογικές ανοσο-αποκρίσεις. Ένας πιθανός μηχανισμός για την ανοσιακή δυσλειτουργία, ως απόκριση σε χρόνια στρες είναι η μείωση των τελομερών και η μείωση της δράσης της τελομεράσης, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα στην πρόωρη γήρανση του ανοσοποιητικού συστήματος [26]. Έρευνες σε πειραματόζωα, με αυξημένα επίπεδα άγχους, έδειξαν αυξημένη ενεργοποίηση μικρογλοίας και περιαγγειακών μακροφάγων στον εγκέφαλο, σε σύγκριση με στελέχη με χαμηλότερα επίπεδα άγχους [27], το οποίο υποδηλώνει ότι το άγχος μπορεί να αυξήσει τη φλεγμονή στον εγκέφαλο. Ως εκ τούτου, η νευρο- φλεγμονή διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο και στην ανάλυση των παθολογικών καταστάσεων [28]. Φλεγμονώδεις αποκρίσεις στο εγκεφαλικό παρέγχυμα έχουν συσχετιστεί με την αιτιοπαθογένεια διαφόρων νευρολογικών και νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως λοίμωξη του ΚΝΣ, εγκεφαλική ισχαιμία, σκλήρυνση κατά πλάκας, AD και PD [29, 30]. Διάφορα κύτταρα του ΚΝΣ, όπως η μικρογλοία, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, και οι νευρώνες, παράγουν μια πληθώρα από διαμεσολαβητές της φλεγμονής, οι οποίοι δρουν με παρακρινή ή αυτοκρινή τρόπο, οδηγώντας σε έναν πολύπλοκο δίκτυο επικοινωνίας μεταξύ των διαφόρων κυττάρων [28]. Συνεπώς, οι επιδράσεις της φλεγμονής στη νευροδιαβίβαση, οι οποίες προκαλούνται από τη μεσολάβηση κυτοκινών και άλλων παραγόντων από τα ενεργοποιημένα νευρογλοιακά κύτταρα, φαίνεται να είναι οι κύριοι παράγοντες στην εξέλιξη της εκφύλισης,

Νεότερες έρευνες αναφέρουν πως ορισμένα microRNAs, τα οποία εκφράζονται στο ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης, αποτελούν ρυθμιστές κλειδιά στην ανάπτυξη και στη πλαστικότητα του ΚΝΣ. Τα μόρια αυτά εμπλέκονται στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η συμμετοχή διαφόρων, εξελικτικά συντηρημένων, microRNAs είναι το κλειδί στις διακεκριμένες αναπτυξιακές διεργασίες του ΚΝΣ πολλών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Τα microRNAs ειδικότερα, αναγνωρίζουν και ρυθμίζουν την έκφραση των mRNA στόχων με συμπληρωματικότητα αλληλουχίας εντός της 3' αμετάφραστης περιοχής, όπου ένα απλό microRNA μπορεί να έχει διάφορα mRNA στόχους για να ρυθμίσει μια διαδικασία. Ομοίως, ένα μοναδικό mRNA μπορεί να στοχεύεται από περισσότερα από ένα microRNA. Έτσι, με τη ρύθμιση των διαφορετικών γονιδίων-στόχων, τα microRNAs έχουν αποδειχθεί ότι προάγουν τη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστοκυττάρων και των νευρικών προγόνων σε ειδικούς τύπους νευρικών κυττάρων, ή επάγουν τον πολλαπλασιασμό νευρικών βλαστικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί, μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν την έκφραση αυτών των microRNAs κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της νευρογένεσης, αποτελούν διαδικασίες, οι οποίες σχετίζονται άμεσα με τη δημιουργία νευροεκφυλιστικών νόσων [31].

1.2 Νευροεκφυλιστικές Νόσοι.

1.2.1 Νόσος του Alzheimer's (Alzheimer Disease- AD)

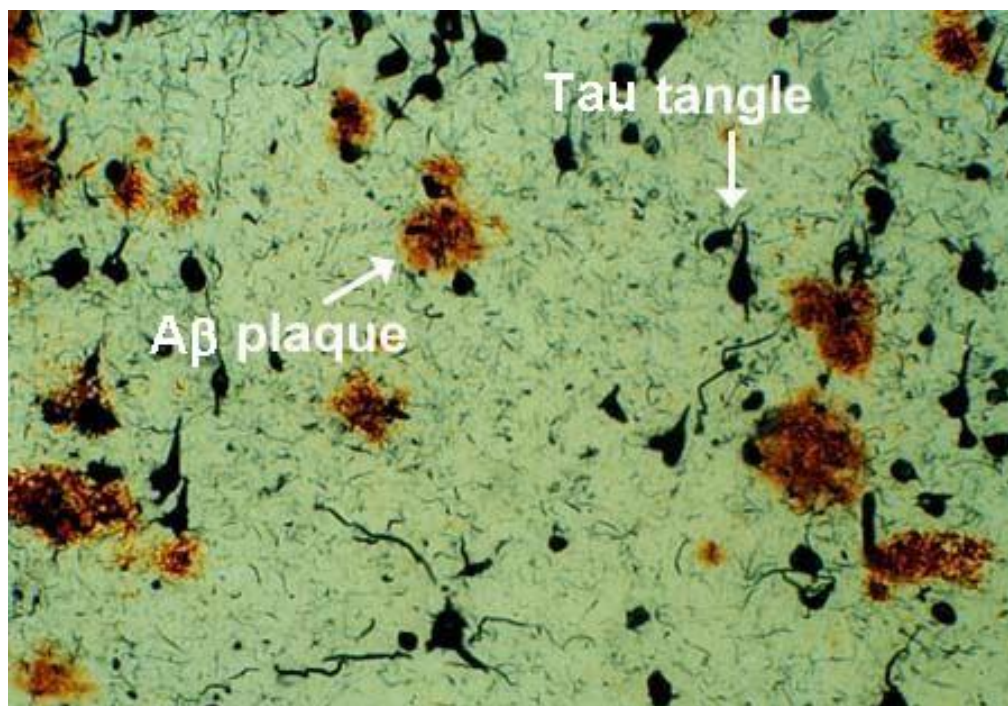
Η AD, χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια μνήμης, αλλαγές στην προσωπικότητα, στην συμπεριφορά, στην κρίση και εξασθένηση γνωστικών λειτουργιών [32]. Είναι μια μη θεραπεύσιμη, εκφυλιστική και θανατηφόρα νόσος, η οποία περιγράφηκε αρχικά από το Γερμανό ψυχίατρο και νευροπαθολόγο Alois Alzheimer το 1906. Ωστόσο, αναγνωρίστηκε ως η πιο κοινή μορφή άνοιας, τη δεκαετία του 1960 από τους Blessed, Tomlinson και Roth [33]. Είναι μία νευροεκφυλιστική διαταραχή του ΚΝΣ που συνδέεται με εσφαλμένη πτύχωση και συσσωμάτωση πρωτεϊνών στον εγκέφαλο. Είναι δε η πιο συχνή μορφή άνοιας σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών [34]. Υπάρχουν δύο μορφές της νόσου AD: Η σποραδική, που αφορά το ~95% των περιπτώσεων και η κληρονομική ή γενετική που αφορά μόλις το ~5% και η οποία έχει επικρατή αυτοσωμικό τρόπο κληρονομικότητας (πρώιμη κληρονομική μορφή AD) και έχει ταυτιστεί ήδη από τη δεκαετία του '90 με συγκεκριμένα γονίδια (APP- 1991, presinilin1- 1995, presinilin2- 1995). Τα αίτια της νόσου στην πιο συχνή της μορφή είναι σαφώς πιο περίπλοκα: υπάρχουν συγκεκριμένα γονίδια που έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση της νόσου και εξηγούν μέχρι ένα σημείο την εμφάνισή της, αλλά η αιτία της νόσου φαίνεται να είναι ένας πιο περίπλοκος συνδυασμός γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, καθώς και απόρροια συγκεκριμένων μηχανισμών του οργανισμού.

1.2.1.1 Νευροπαθολογία της νόσου AD

Στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών χαρακτηριστικών μπορεί να συμμετέχουν μορφολογικές τροποποιήσεις που μπορεί να δημιουργούνται φυσιολογικά κατά τη γήρανση. Κατά τη γήρανση, ο εγκέφαλος υφίσταται διάφορες αλλαγές, οι οποίες μπορεί να προσομοιάζουν με τις αντίστοιχες αλλαγές της νόσου, αλλά δεν είναι πανομοιότυπες. Για παράδειγμα, η συρρίκνωση μέρους του εγκεφάλου, πχ του προμετωπιαίου λοβού και του ιππόκαμπου. Η “υπόθεση του αμυλοειδούς”, η οποία είναι η κύρια ιστοπαθολογική βάση για την παθογένεση της AD, έχει ως κύριο χαρακτηριστικό τη συσσώρευση του β- αμυλοειδούς (Aβ-42) στον εγκέφαλο. Το γεγονός αυτό, πυροδοτεί φλεγμονώδη απόκριση, μέσω ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου. Συμπεριλαμβάνει δε και την υπερφωσφορυλίωση της tau πρωτεΐνης, ατροφία του εγκεφαλικού ιστού, λόγω επιλεκτικής απώλειας νευρώνων, και δημιουργία νευροϊνιδιακών κόμβων (Neurofibrillary tangles) και πλάκων του αμυλοειδούς (senile Aβ- plaques) [35, 36]. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι συσσώρευση

του Αβ (1-42), και συγκεκριμένα του Αβ-42, είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής για εμφάνιση γνωστικής δυσλειτουργίας, εφόσον βρέθηκε και σε εγκεφάλους ασθενών που δεν εμφάνισαν άνοια [37]. Συμπερασματικά, επιπλέον παράγοντες συμβάλλουν στην εξέλιξη της AD. Οι νευροϊνιδιακοί κόμβοι είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί, οπότε η συσσώρευσή τους δεν μπορεί να κατασταλεί από τον εγκέφαλο. Όταν το φορτίο των πλακών του αμυλοειδούς φτάσει σε νευροτοξικά επίπεδα, καταστρέφονται οι προεκβολές των γειτονικών νευρώνων. Η καταστροφή περιοχών του εγκεφάλου δημιουργεί όλες τις νοητικές διαταραχές που έχουν συνδεθεί με τη νόσο. Σε ακραίες περιπτώσεις, οι νευροϊνιδιακοί κόμβοι συσσωρεύονται γύρω από αγγεία, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην εκροή αίματος στον εγκέφαλο και σε εγκεφαλικό επεισόδιο [38].

Όλα τα παραπάνω έχουν σαν αποτέλεσμα σε αρχικό ακόμη στάδιο να παρατηρούνται συνήθως ελλείμματα στη μνήμη, αλλαγές της διάθεσης, απάθεια και σύγχυση. Σε τελικό στάδιο παρατηρούνται διαταραχές στην ομιλία, απραξία ή ακόμα και εγκεφαλικά επεισόδια, παράλυση περιοχών του προσώπου, και κρίσεις όμοιες με τις επιληπτικές [38].



Εικόνα 1.2.1.1.1: Δείγμα μεταθανάτιου ιστού από εγκέφαλο ασθενούς με AD. Απεικονίζονται πλάκες αμυλοειδούς και νευροϊνιδιακοί κόμβοι (φωτογραφία D. Bredesen).

1.2.1.2 Μοριακή και Γενετική Βάση της AD

Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικά μόρια εμπλέκονται στη νόσο, με κυριότερη τη γονιδιακή μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 21 της APP πρωτεΐνης, μεταλλάξεις στο πεπτίδιο Αβ και την πρωτεΐνη tau (Πίνακας 1.1.1.1) Επίσης, στη νόσο εμπλέκονται ακόμη τρία γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για: την απολιποπρωτεΐνη Ε (apoE4), την πρεσενιλίνη 1 (PS 1, γονιδιακή μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 14), και την πρεσενιλίνη 2 (PS 2, γονιδιακή μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 1) [39]. Τα γενετικά ελλείμματα των μορίων που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα οδηγούν σε αυξημένη βιοσύνθεση, αυξημένη συσσώρευση ή μειωμένη απομάκρυνση του Αβ.

1.2.1.2.1 Πρόδρομη Πρωτεΐνη του Αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein- APP).

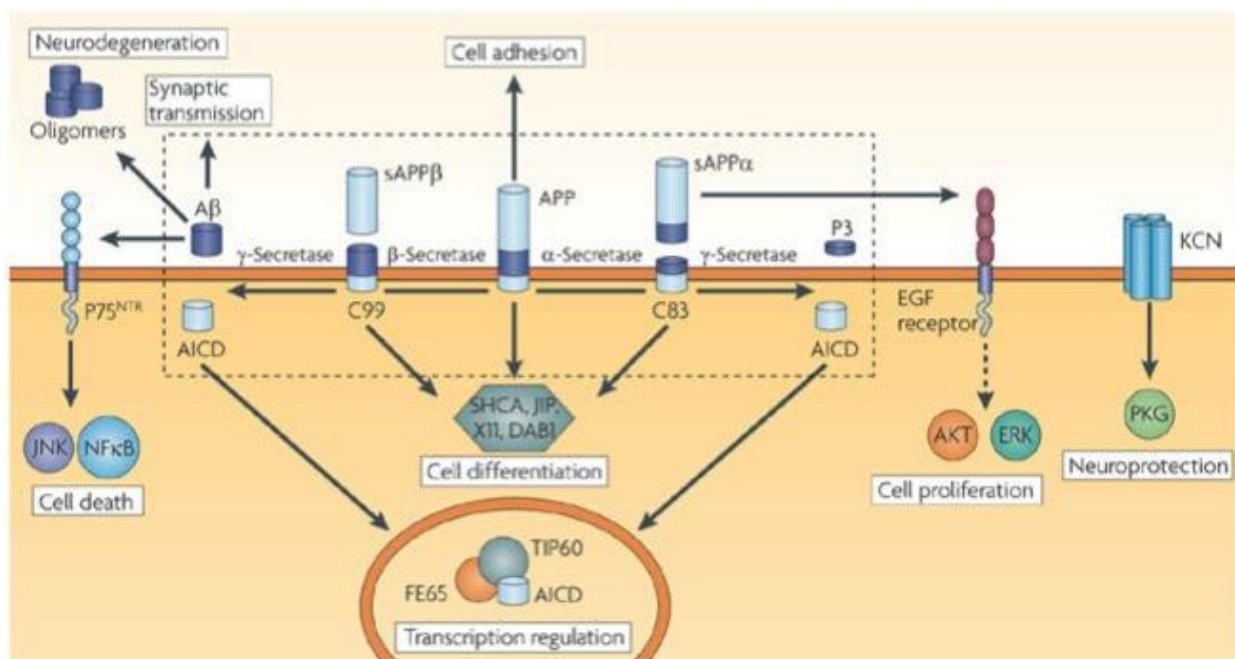
Η APP έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε πολλαπλά επίπεδα. Για παράδειγμα έχει μελετηθεί η δομή της, έχουν δημιουργηθεί μοντέλα διαγραφής σε συστήματα μυών, μυών και σκωλήκων. Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες αναλύσεις της υποκυτταρικής κίνησής της, μεταφραστικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της και μια τεράστια λίστα δυνητικών λειτουργιών, χωρίς όμως να αποσαφηνιστεί πλήρως ο βιοχημικός της ρόλος [40]. Η κατανόηση της βιολογικής σημασίας της APP, εξακολουθεί να αποτελεί μία σημαντική επιστημονική πρόκληση παγκοσμίως. Η δυσλειτουργία ή/και η τροποποίηση της αλληλεπίδρασης της APP με άλλα πρωτεϊνικά, και μη μόρια, αποτελεί το υπόστρωμα για τη διακύμανση των παραγόμενων εξ' αυτής Αβ και για την τροποποίηση των επιπέδων έκφρασής αυτής και των ισομορφών της. Για παράδειγμα, εγκεφαλικά τραύματα σχετίζονται με την αύξηση της έκφραση της APP, καθώς και τις εξωκυττάρια εναποθέσεις πεπτιδίων αμυλοειδούς [40]. Ένα από τα κύρια μοντέλα μελέτης της πρωτεΐνης αυτής, είναι οι κυτταρικές καλλιέργειες. Πολλοί ερευνητές επικεντρώνονται σε συγκεκριμένες περιοχές της και ως εκ τούτου μια πληθώρα λειτουργιών έχουν αποδοθεί σε κάθε μία από αυτές. Πολλές από αυτές τις μελέτες, βασίζονται στην υπερέκφραση της APP ή/και στη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων καθαρισμένων πρωτεϊνικών θραυσμάτων, οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο μη φυσιολογικών αποκρίσεων. Επιπλέον, επειδή ο χρόνος μεταξύ πρωτεϊνοσύνθεσης και αποικοδόμησής της είναι πολύ σύντομος [41], είναι πιθανό ότι η APP διαδραματίζει κυρίως ρυθμιστικό, παρά δομικό ρόλο στο κύτταρο, κάτι το οποίο καθιστά τη μελέτη της ακόμη πιο δύσκολη. Μία σημαντική προσέγγιση για τη μελέτη της APP, είναι η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πολλές από τις προτεινόμενες λειτουργίες της APP και των προϊόντων της, σχετίζονται με μια σειρά από κοινές βιολογικές διεργασίες, όπως είναι η νευρωνική ανάπτυξη, ο σχηματισμός των δενδριτών, η

συναπτογένεση. Διεργασίες οι οποίες απαιτούν πολύ καλά οργανωμένες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Γίνεται επίσης σαφές, πως εξωκυττάρια αλλά και ενδοκυττάρια τμήματα της APP εμπλέκονται στις διεργασίες αυτές και είναι εντυπωσιακό πως η APP μπορεί να λειτουργήσει και στις δύο πλευρές της πλασματικής μεμβράνης, συνδέοντας εξωκυττάρια σήματα με ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης (ρύθμιση Ca^{2+} , αλληλεπιδράσεις με τον κυτταροσκελετό ή/ και με πρωτεϊνικές κινάσες) [40].

Η μελέτη της δομής της APP έχει δείξει ότι πρόκειται για μία διαμεμβρανική τύπου I γλυκοπρωτεΐνη με μεγάλη εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή και μια μικρή καρβοξυτελική. Η εναλλακτική συρραφή του γονιδίου, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων ισομορφών, κυριότερες των οποίων είναι οι 695, 751 και 770 αμινοξικών καταλοίπων. Οι δύο μεγαλύτερες ισομορφές, περιέχουν μία επιπλέον περιοχή των 56 αμινοξέων στη μέση της αλληλουχίας, η οποία δομικά και λειτουργικά σχετίζεται με αναστολές πρωτεασών τύπου Kunitz [42]. Εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο αλλά και στα νεφρά, αν και μπορεί να εντοπιστεί έκφραση και σε άλλους ιστούς. Το γονίδιο της APP στο ανθρώπινο γονιδίωμα, εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 21 και περιέχει τουλάχιστον 18 εξώνια. Εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου παράγει διάφορα mRNA, τα οποία κωδικοποιούν αρκετές ισομορφές, το μήκος των οποίων κυμαίνεται από 365 έως 770 αμινοξέα.

Πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

Η APP υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία από 3 πρωτεάσες: α- εκκριτάση, β- εκκριτάση και γ- εκκριτάση. Τα προϊόντα της πρωτεολυτικής δραστηριότητας έχουν διαφορετική μοίρα. Με τη δράση της α- και γ- εκκριτάσης παράγονται η α- APP και η P3 πρωτεΐνη, ενώ με τη β- και τη γ- εκκριτάση παράγεται το Αβ αμυλοειδές που περιέχει μια περιοχή με 40-42 αμινοξέα. Συσώρευση του Αβ αμυλοειδούς σχηματίζει το κέντρο της πλάκας του αμυλοειδούς και υπάρχει μια περιοχή που συνδέεται με το C1q και ενεργοποιεί την κλασσική οδό του συμπληρώματος. Το ενδοκυττάριο καρβοξυλικό άκρο (αμινοξέα 657-676) ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες G με αποτέλεσμα ένα καταρράκτη από γεγονότα που οδηγούν στην απόπτωση των νευρώνων [43]. Απορρύθμιση της πρωτεϊνικής κινάσης από μουσκαρινικούς υποδοχείς οδηγεί σε αύξηση της α- εκκριτάσης και σε μείωση του Αβ αμυλοειδούς. Επίσης, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα στον ορό για τους υποδοχείς αυτούς όπως η ακετυλοχολίνη και η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) είναι μη φυσιολογικά στην AD [44].



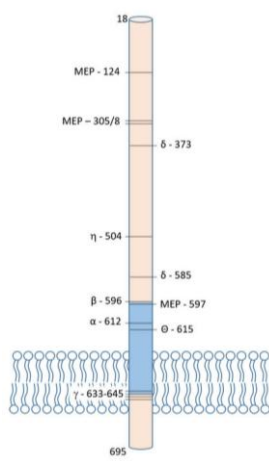
Εικόνα 1.2.1.2.1.1: Επεξεργασία της APP και εμπλεκόμενα μονοπάτια σηματοδότησης: Στην εικόνα απεικονίζονται τα εναλλακτικά μονοπάτια επεξεργασίας της APP: Η διαδοχική πρωτεολυτική διάσπασή της, με τη δράση των α- και γ- εκκριτασών (μη- αμυλοειδικό μονοπάτι, προς τα δεξιά), ή με τη δράση των β- και γ- εκκριτασών (αμυλοειδικό μονοπάτι, προς τα αριστερά). Επίσης, παρουσιάζονται και οι δράσεις της, καθώς και τα διάφορα προϊόντα επεξεργασίας. Η APP παίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση, ενώ το διαλυτό κλάσμα της (sAPPα), θεωρείται ότι συνεργάζεται με τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα EGF για την επαγωγή του νευρικού πολλαπλασιασμού μέσω εξωκυττάριου σήματος, ρυθμιζόμενο από την κινάση ERK και AKT. Επιπλέον, η sAPPα, άμεσα ή έμμεσα, ενεργοποιεί τα υψηλής αγωγιμότητας κανάλια (KCN) και την cGMP- εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση PKG, για να προστατέψει τους νευρώνες από την τοξικότητα διέγερσης. Το Αβ πεπτίδιο, με τη σειρά του επηρεάζει τη συναπτική λειτουργία, ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο, μέσω της πρόσδεσής του στον υποδοχέα νευροτροφίνης (p75^{NTR}) και σχηματίζει νευροτοξικά ολιγομερή και πλάκες. Το κυτταροπλασματικό μέρος της πλήρους μήκους APP, καθώς και τα μεμβρανο- σχετιζόμενα καρβοξυτελικά θραύσματα C99 και C83, αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς προσδέτες και μόρια σηματοδότησης, που εμπλέκονται με διάφορα κυτταρικά μονοπάτια διαφοροποίησης (π.χ. SHCA, JIP, X11 και DAB1). Τέλος, το διαλυτό ενδοκυττάριο κλάσμα της APP (AICD) μπορεί να δράσει και ως μεταγραφικός ρυθμιστικός παράγοντας, μέσω σύνδεσής του με την πρωτεΐνη FE65 και την ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης TIP60 στον πυρήνα [45].

Όπως πολλές άλλες πρωτεΐνες με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά, έτσι και η APP υπόκειται σε διαδικασία «shedding», δηλαδή στην απόρριψη θραυσμάτων εκτομής, διαμεσολαβούμενη από πρωτεάσες. Όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, υπάρχουν διάφοροι τρόποι πρωτεόλυσης της APP, δημιουργώντας διακριτά μεταβολικά προϊόντα [46]. Το πλαίσιο γι' αυτά τα μονοπάτια βασίζεται στο μεταβολικό κύκλο της APP, ο οποίος ξεκινά με μετάφραση στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ακολουθεί γλυκοζυλίωση και ωρίμανση μέσω της συστήματος Golgi, αφού παρουσιαστεί η APP στην πλασματική

μεμβράνη και ανακυκλωθεί. Στο σημείο αυτό, η APP μπορεί να επιστρέψει στην κυτταρική επιφάνεια ή να διασχίσει το ενδοσωμικό σύστημα. Η παρουσία της σε κάθε έναν από αυτούς του προορισμούς σχετίζεται με συγκεκριμένη πρωτεολυτική επεξεργασία, αφού τα ένζυμα τα οποία πρωτεολύουν την APP, κατανέμονται χωρικά στα κυτταρικά διαμερίσματα [47]. Αν και μόνο δύο μεταβολικά-πρωτεολυτικά μονοπάτια έχουν περιγραφεί εκτενώς, πρόσφατα ανακαλύφθηκαν επιπλέον τέσσερις τρόποι επεξεργασίας της APP [48] (Πίνακας 1.2.1.2.1.1). Επίσης, στην εικόνα 1.2.1.2.1.2, συνοψίζονται οι θέσεις υδρόλυσης του πεπτιδικού δεσμού που εμφανίζονται στα περιγραφόμενα μονοπάτια.

	Activity	Products	Activity	Products	Activity	Products
Pathway 1			α -secretase	sAPP α , CTF α	γ -secretase	P3, AICD
Pathway 2			β -secretase	sAPP β , CTF β	γ -secretase	A β , AICD
Pathway 3	η -secretase	sAPP η , CTF η	α -secretase	A η - α , CTF α	γ -secretase	P3, AICD
			β -secretase	A η - β , CTF β	γ -secretase	A β , AICD
Pathway 4	δ -secretase	sAPP δ_{373} sAPP δ_{585} sAPP $\delta_{374-585}$ CTF δ_{586} CTF δ_{374}	α -secretase	sAPP $_{586-612}$ CTF α	γ -secretase	P3, AICD
			β -secretase	sAPP $_{586-596}$ CTF β	γ -secretase	A β , AICD
Pathway 5			θ -secretase	sAPP θ CTF θ	γ -secretase	P3-like, AICD
Pathway 6			β -secretase (Meprin)	sAPP $_{18-124}$ sAPP $_{18-305/308}$ sAPP β_2 CTF β_2	γ -secretase	A β_2 , AICD

Πίνακας 1.2.1.2.1.1: Πρωτεολυτικά μονοπάτια του μεταβολισμού της APP: Η πρωτεόλυση ξεκινά με την πλήρους μήκους APP και συνεχίζει προς τα δεξιά (CTF: C- terminal θραύσμα; AICD: ενδοκυτταρικό κλάσμα της APP).



Εικόνα 1.2.1.2.1.2: Το ενδοκυτταρικό κλάσμα της APP υπόκεινται σε πρωτεόλυση σε πολλαπλές θέσεις από διαφορετικές εκκρινάσεις. Οι αριθμοί αναφέρονται στο αμινοξύ, στο οποίο ασκείται η ενζυμική δράση της πρωτεάσης και έχει σαν αποτέλεσμα την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού του αμινοξέος. Όλοι οι αριθμοί χρησιμοποιούν την αρίθμηση των ισομορφών APP695. Το N-τελικό άκρο

ξεκινά από τον αριθμό 18, εξαιτίας της αποκοπής του πεπτιδικού σήματος κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης. Η σκίαση υποδεικνύει την περιοχή του πεπτιδίου Αβ [48].

Όπως αναφέρθηκε, ανάλογα με την περιοχή δράσης της η APP συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες. Έρευνες έχουν δείξει πως η εξωκυττάρια περιοχή της APP, λειτουργεί ως υποδοχέας στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, ο οποίος παρομοιάζει τον υποδοχέα Notch. Η αλληλεπίδραση της APP, η οποία δρα ως υποδοχέας, με διάφορες πρωτεΐνες αποδείχθηκε πως επηρεάζει την παραγωγή του Αβ, αλλά και τη σηματοδότηση [49]. Επίσης, οι περιοχές E1 και E2 έχει δειχθεί να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας και με πρωτεογλυκάνες, υποστηρίζοντας το ρόλο της στην κυτταρική προσκόλληση. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πως η E2 περιοχή της APP μπορεί να σχηματίσει αντιπαράλληλα διμερή, μία δομή η οποία έχει την ικανότητα να συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση. Άλλη μία σημαντική λειτουργία της εξωκυττάριας περιοχής της APP, είναι ο νευροτροφικός ρόλος της και η συμμετοχή της στη συναπτογένεση. Στις λειτουργίες αυτές συμμετέχει η πλήρους μήκους APP, αλλά και το εκκρινόμενο μόριο μετά από την πρωτεόλυση της τελευταίας [49].

Η ενδοκυτταρική περιοχή της APP παίζει κυρίως ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση καθώς και στην αξονική μεταβίβαση σήματος. Συγκεκριμένα, η APP μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε συγκεκριμένα σημεία της εξωκυττάριας και ενδοκυττάριας περιοχής. Οι δράσεις κινάσων επί της APP, έχουν συνδεθεί με τη ρύθμιση της τοπολογίας της APP στην ανάπτυξη κώνων και νευρώνων. Επίσης, η κυτταρική μετανάστευση και η διαμόρφωση συνάψεων, είναι λειτουργίες για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει η ενδοκυττάρια περιοχή της APP.

Μέχρι στιγμής, αναφέρθηκαν θετικές/ ευεργετικές ιδιότητες της APP. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εκτενής λίστα κυτταροτοξικών ιδιοτήτων της APP, ιδιαίτερα όταν υπερεκφράζεται η APP ή το καρβοξυτελικό θραύσμα της C99 ή C100. Η υπερέκφραση του C100 της APP (CTF) έχει συσχετιστεί με το νευροεκφυλισμό στον εγκέφαλο [50], πιθανώς διαταράσσοντας τη μεταγωγή σήματος της APP. Μία άλλη οδός, μέσω της οποίας το CTF της APP γίνεται νευροτοξικό, είναι μέσω του ενδοκυττάριου τμήματος της τελευταίας. Συγκεκριμένα, η νευροτοξικότητα του CTF φαίνεται να απαιτεί μια ακέραια θέση κασπάσης εντός του κυτοσολικού άκρου [51]. Απώλεια της θέσης αυτής μέσω μετάλλαξης στη θέση 664 από ασπαρτικό σε αλανίνη (D664A), έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της κυτταροτοξικότητας του C100 της APP. Επίσης, έχει προταθεί πως η απελευθέρωση μικρότερων θραυσμάτων (C31 και Jcasp) από την ενδοκυττάρια περιοχή της APP μετά από πρωτεόλυση στην θέση 664, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή νέων κυτταροτοξικών APP πεπτιδίων [52]. Πράγματι, σε διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση στη θέση της κασπάσης, ώστε να καταστήσει την APP μη διασπώμενη, οι προβλεπόμενοι Αβ- σχετιζόμενοι φαινότυποι στον εγκέφαλο,

συμπεριλαμβανομένων των συναπτικών, συμπεριφορικών και ηλεκτροφυσιολογικών ανωμαλιών, απουσίαζαν παρά τις άφθονες εναποθέσεις αμυλοειδούς στον εγκέφαλο. Επομένως, η απελευθέρωση των μικρότερων θραυσμάτων (C31 ή Jcasp) μετά τη διάσπαση της κασπάσης του C99, μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση γονιδίων που συμβάλλουν στον κυτταρικό θάνατο με τρόπο ανεξάρτητο από τη γ -εκκριτάση. Ως εκ τούτου, υπάρχουν επί του παρόντος διάφοροι δυνητικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η APP μπορεί να συμμετέχει στη νευροτοξικότητα: μέσω διάσπασης γ -εκκριτάσης για να απελευθερωθεί το ενδοκυτταρικό τμήμα της APP ή μέσω εναλλακτικής διάσπασης του καρβοξυτελικού άκρου της για να απελευθερωθούν άλλα κυτταροτοξικά πεπτίδια [53].

1.2.1.2.2 Η Πρωτεΐνη Ταυ.

Στην παθογένεση της νόσου εμπλέκεται και η πρωτεΐνη tau. Ανήκει στις μικρομοριακές πρωτεΐνες που σχετίζονται με μικροσωληνίσκους (Microtubule Associated proteins, MAPs) και βρίσκεται σε αφθονία στο ΚΝΣ, κυρίως στους νευράξονες. Επιπλέον, η Ταυ εκφράζεται στους άξονες των νευρώνων του ΠΝΣ και σε μικρότερο βαθμό στα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα ΚΝΣ, αλλά και σε άλλους ιστούς, όπως στα νεφρά και στους πνεύμονες. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και αποτελείται από 16 εξώνια [54]. Ο φυσιολογικός ρόλος της είναι να προσδένεται γρήγορα και αντιστρεπτά στην εξωτερική επιφάνεια των μικροσωληνίσκων αλλά και στο εσωτερικό τους, με την αμινοτελική και καρβοξυτελική της περιοχή να προβάλλει προς το εξωτερικό των μικροσωληνίσκων [55]. Το αμινοτελικό της άκρο συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, πιθανώς ως μέρος ενός συμπλέγματος σχετιζόμενου με τη μεμβράνη, ρυθμίζοντας την απόσταση μεταξύ των μικροσωληνίσκων. Υποστηρίζεται πως οι αλληλουχίες των επαναλαμβανόμενων μοτίβων δεσμεύονται άμεσα στους μικροσωληνίσκους, μέσω του θετικού τους φορτίου, που αλληλεπιδρά με τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα της σωληνίνης [56]. Επιπλέον, εμπλέκεται στην αξονική μεταφορά, την οποία και τροποποιεί [57]. Ως εκ τούτου, η tau καθορίζει τη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων με αποτέλεσμα τη συντήρηση της κυτταρικής δομής (αξονικοί μικροσωληνίσκοι). Η μεγαλύτερη ισομορφή της ανθρώπινης πρωτεΐνης tau διαθέτει 85 θέσεις φωσφορυλίωσης (80 Ser/ Thr και 5 Tyr). Η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau έχει σαν αποτέλεσμα την έκπτωσή της από τους μικροσωληνίσκους και την αποσταθεροποίησή τους, την αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης της tau και τη διευκόλυνση σχηματισμού νευροϊνδιακών κόμβων, καθώς και την απορρύθμιση της ενδονευρωνικής κυκλοφορίας, αναστολή πρωτεασών και νευρωνικό θάνατο. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι ο αριθμός των νευροϊνδιακών κόμβων συσχετίζεται θετικά με τη βαρύτητα

της νόσου, και πως ο αριθμός των τελευταίων και ο αριθμός των νεκρών νευρώνων αυξάνονται παράλληλα στην πορεία εξέλιξης της νόσου [58-61].

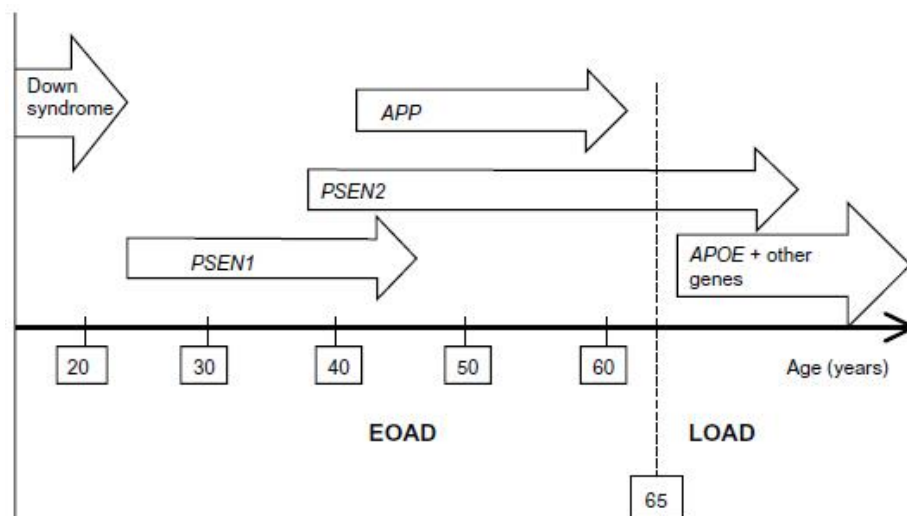
1.2.1.2.3 Η Απολιποπρωτεΐνη E (ApoE).

Η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE), είναι ο κύριος μεταφορέας χοληστερόλης στον εγκέφαλο και αποτελεί ουσιαστικής βαρύτητας παράγοντα για την ανάπτυξη των νευραξόνων. Συντίθεται από τα αλληλόμορφα ε2, ε3 και ε4 με τη μορφή τριών ισοενζύμων των E2, E3 και E4. Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη (34kDa), Η ApoE συνδέεται με διάφορους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που εμπλέκονται στην μεταφορά λιπιδίων, στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στην νευρωνική σηματοδότηση και στην μιτοχονδριακή λειτουργία και εκφράζεται στο ήπαρ και στον εγκέφαλο [62]. Η ύπαρξη του αλληλόμορφου ε4 στο γονίδιο για την απολιποπρωτεΐνη E, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, αποτελεί ισχυρό παράγοντα τόσο για την όψιμη οικογενή μορφή της νόσου, όσο και για τη σποραδική μορφή. Βρέθηκε ότι επηρεάζει την παραγωγή, την κατανομή και την εκκαθάριση του Αβ στις πλάκες και στους νευροϊνιδιακούς κόμβους [63]. Άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο ε4 έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο, κυρίως σε οικογένειες με μεταλλάξεις στην APP. Η απολιποπρωτεΐνη E4 συνδέεται με το Αβ, το οποίο μεταφέρεται από τα αστροκύτταρα στην επιφάνεια των νευρώνων και ανακυκλώνεται μέσω των ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων.

1.2.1.2.4 Πρεσενιλίνες

Οι πρεσενιλίνες 1 και 2 είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, τα γονίδια των οποίων βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και οι μεταλλάξεις των οποίων είναι υπεύθυνες πάνω από 90% για τον αυτοσωμικό τύπο της πρώιμης οικογενούς νόσου AD. Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες αυτές είναι σημαντικές για την πρώιμη οικογενή μορφή της νόσου. Οι περίπου 30 μεταλλάξεις στα γονίδια της πρεσενιλίνης 1 και πρεσενιλίνης 2 είναι υπεύθυνες για 50% της πρώιμης οικογενούς μορφής της νόσου [64]. Μεταλλάξεις του γονιδίου της APP, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 και οι οποίες αφορούν το 18% των μεταλλάξεων, προκαλούν τη νόσο σε ηλικίες μεταξύ 45 και 65 ετών. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται κοντά στις θέσεις πρωτεόλυσης της APP από τις εκκριτάσες. Έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής Αβ1- 40 (Swedish), άλλες την αύξηση παραγωγής Αβ1- 42 (London), άλλες την αύξηση της συσσώματωσης της Αβ (Arctic), ενώ άλλες εμποδίζουν την αποικοδόμηση του Αβ (Glu693Lys, Glu693Gly, Glu693del, Asp694Asn) [65]. Μεταλλάξεις του γονιδίου της πρεσενιλίνης 1 (χρωμόσωμα 14), είναι πάνω από 180 και αφορούν το 78% των μεταλλάξεων. Εντοπίζονται διάχυτα σε

όλο το μήκος του μορίου και προκαλούν τη νόσο σε ηλικίες μεταξύ 30 και 55. Οι μεταλλάξεις αυτές, οδηγούν σε αύξηση, μείωση ή δεν επηρεάζουν την παραγωγή Αβ. Τέλος, οι μεταλλάξεις του γονιδίου της πρεσενιλίνης 2 (χρωμόσωμα 1), είναι 12, αφορούν το 4% των μεταλλάξεων, προκαλούν τη νόσο σε ηλικίες 39 και 75 ετών και επηρεάζουν την παραγωγή Αβ [66].



Εικόνα 1.2.1.2.4.1: Η έναρξη της νόσου (AD), ανάλογα με τη διαφορετική συμμετοχή των γονιδίων. Τα συμπτώματα της άνοιας μπορεί να εμφανιστούν σε νεότερη ηλικία σε ασθενείς με σύνδρομο Down και σε ασθενείς με AD χωρίς τρισωμία [62].



Εικόνα 1.2.1.1.1: Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου.

Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι η αυξημένη παραγωγή ή η μειωμένη εκκαθάριση του Αβ αμυλοειδούς πεπτιδίου, η οποία προκαλείται από ποικίλες γενετικές, μοριακές ή περιβαλλοντολογικές

συνθήκες, οδηγούν στη συσσώρευση του Αβ και στην ευόδωση της φλεγμονής, η οποία προκαλεί τοπική ιστική βλάβη. Το τελευταίο προκαλεί στη συνέχεια αύξηση της φλεγμονής.

Ο μηχανισμός νευροτοξικότητας του Αβ αποτελείται από διάφορα στάδια. Αυτά περιλαμβάνουν την ενσωμάτωσή του στις κυτταρικές μεμβράνες, την παραγωγή ελεύθερων ριζών, την επαγωγή της απόπτωσης, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και άρα την υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών οξείας φάσης. Επιπρόσθετα, το Αβ αποσταθεροποιεί την ομοιοστάση του ασβεστίου, επάγει τον σχηματισμό νευροϊνδιακών κόμβων και ενεργοποιεί τις κινάσες GSK3β και cdk5, οι οποίες υπερφωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη tau. Η κυτταρική βλάβη οδηγεί σε μεταβολικές αλλαγές και η εμμένουσα φλεγμονή καταλήγει στη διαταραχή των συνάψεων και στη συνέχεια στον κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 1.2.1.1.2: Η υπόθεση του αμυλοειδούς καταρράκτη δηλώνει ότι μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της κάθαρσης του Αβ στον εγκέφαλο, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του πεπτιδίου, το οποίο αποτελεί το γεγονός εκκίνησης της AD και τελικά οδηγεί σε νευρωνικό εκφυλισμό και άνοια [67].

1.2.2 Νόσος του Parkinson (Parkinson's Disease- PD).

1.2.2.1 Νευροπαθολογία της PD.

Η PD περιγράφηκε από τον James Parkinson το 1817. Το κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι ο προοδευτικός εκφυλισμός των νευρώνων των βασικών γαγγλίων, ιδιαίτερα των ντοπαμινεργικών κυττάρων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars compacta) και μείωση των επιπέδων της ντοπαμίνης (Dopamine- DA) στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου [68, 69]. Η νόσος του PD αποτελεί μία από τις συνηθέστερες νευροεκφυλιστικές ασθένειες του εγκεφάλου, μετά τη AD και αφορά το κεντρικό, το περιφερικό νευρικό σύστημα, καθώς και το σύστημα των εντερικών νευρώνων [70]. Τα κύρια κλινικά συμπτώματα της νόσου είναι ο τρόμος, η βραδυκίνησία, η ακαμψία και διαταραχές στη βάδιση, τη στάση, το λόγο και την κατάποση [71, 72], καθώς επίσης και η κατάθλιψη, η έλλειψη όσφρησης, η γρήγορη κίνηση ματιών και διαταραχές ύπνου [73]. Τα συμπτώματα προκύπτουν όταν το 50% των ντοπαμινεργικών νευρώνων που ξεκινούν από τη μέλαινα ουσία και καταλήγουν στο ραβδωτό εκφυλίζονται, με αποτέλεσμα να παρατηρείται δραματική μείωση της DA στο ραβδωτό [74, 75]. Τα κύρια χαρακτηριστικά της νόσου είναι η νευρωνική απώλεια στις συγκεκριμένες περιοχές της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου καθώς και η εκτεταμένη ενδοκυττάρια συσσώρευση της πρωτεΐνης ASYN, χαρακτηριστικά τα οποία αποτελούν προϋπόθεση για τη διάγνωση της νόσου. Στα αρχικά στάδια της νόσου, η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων περιορίζεται στην πλευροκοιλιακή μέλαινα ουσία με λιγοστή εξάπλωση σε άλλους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του μεσεγκεφάλου, η οποία επεκτείνεται στα τελικά στάδια. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η δραματική απώλεια αυτών των ντοπαμινεργικών νευρώνων ακόμη και στα αρχικά στάδια, υποδεικνύουν ότι ο νευροεκφυλισμός σε αυτή την περιοχή ξεκινάει πριν εμφανιστούν τα κινητικά συμπτώματα [76].

Ένα εύλογο ερώτημα που προκύπτει είναι γιατί συγκεκριμένα οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι ευάλωτοι. Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχαν ξεκάθαρες γενετικές αιτίες, παρά μόνο η υπόθεση των μεταβολικών μονοπατιών βιοσύνθεσης της DA. Υπάρχουν ενδείξεις, πως οι μεταβολίτες της DA, έχουν την ικανότητα να αυξήσουν τα επίπεδα των δραστικών ριζών, οι οποίες προκαλούν βλάβες στα κύτταρα, κυρίως στα μιτοχόνδρια. Για παράδειγμα, η νευρομελανίνη προσδένει βαρέα μέταλλα, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών [77, 78]. Μία άλλη υπόθεση υποστηρίζει πως η έκθεση σε περιβαλλοντικές τοξίνες, έχει ως αποτέλεσμα τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η υπόθεση αυτή στηρίχθηκε σε δύο διαφορετικά ευρήματα. Αρχικά, κατά τη δεκαετία του '70 και του '80, ορισμένοι χρήστες απαγορευμένων ουσιών ανέπτυξαν τη νόσο, όπου κατηγορήθηκε η 1- μεθυλ- 4- φαινυλ- 1, 2, 3,

6 - τετραϋδροπυριδίνη (MPTP) [77, 79]. Είναι μια λιποδιαλυτή ουσία και ως εκ τούτου έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, όπου οξειδώνεται σε 1- μεθυλ- 4- φαινυλ- πυριδινίου (MPP+), το οποίο είναι τοξικό. Η ευαισθησία των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην τοξίνη αυτή, οφείλεται στην πρόσληψή της από τους μεταφορείς της DA. Μόλις εισέλθει στο νευρώνα, συγκεντρώνεται στα μιτοχόνδρια και συνδέεται με τη NADH αφυδρογονάση, αναστέλλοντας το σύμπλεγμα I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, οδηγώντας σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία [77, 80]. Κατά δεύτερον, επιδημιολογικές μελέτες είχαν προτείνει μία σύνδεση της νόσου με μακροπρόθεσμη έκθεση σε ορισμένα φυτοφάρμακα. Η ροτενόνη, ένα φυτικό παράγωγο, το οποίο χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο, είναι γνωστό και ως αναστολέας της NADH αφυδρογονάσης. Η χρόνια χορήγηση της ροτενόνης σε τρωκτικά, έχει ως αποτέλεσμα παρκινσονικής συμπεριφοράς και παθολογίας, συμπεριλαμβανομένης και τη δημιουργία εγκλείστων [77, 81]. Επίσης, η χρόνια έκθεση στο ζιζανιοκτόνο paraquat, μπορεί να αλλάξει την έκφραση και τη συσσωμάτωση της ASYN.

1.2.2.2 Μοριακή και Γενετική Βάση της PD.

Υπάρχουν διάφορες μορφές της νόσου. Η κάθε μορφή, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η γήρανση, η γενετική καταβολή του ατόμου και η επίδραση του περιβάλλοντος. Η μορφή της νόσου με γενετική αιτιολογία αφορά μόνο το 5% των περιπτώσεων και ονομάζεται οικογενής τύπος. Προκαλείται από είτε από σημειακές μεταλλαγές, είτε από διπλασιασμούς και τριπλασιασμούς του γονιδίου της ASYN. Η πρώτη σύνδεση κληρονομικότητας, ήταν με τον γενετικό τόπο της ASYN, στο χρωμόσωμα 4, γνωστός ως PARK1. Αρκετοί ακόμη επίτοποι έχουν εμπλακεί, οι κυριότεροι από τους οποίους φαίνονται παρακάτω:

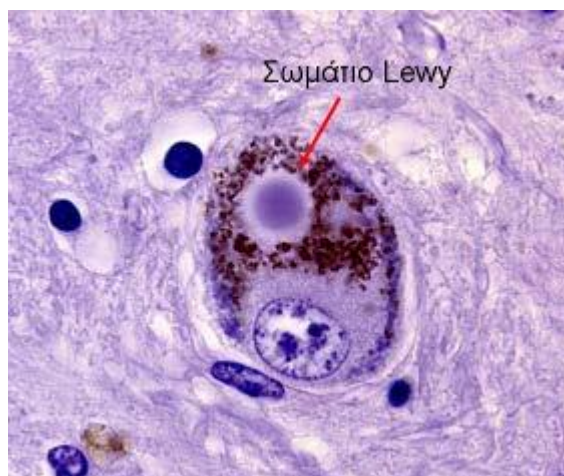
Γενετικός τόπος	Πρωτεΐνη	Λειτουργία
PARK1	ASYN	Πρωτεΐνη συνοδός
PARK2	Parkin	Ουβικιτίνη, Ε3 λιγάση
PARK6	PINK1	Κινάση σερίνης/ θρεονίνης
PARK7	DJ-1	Πρωτεΐνη συνοδός
PARK8	LRRK2	Κινάση σερίνης/ θρεονίνης και τυροσινική κινάση

Πίνακας 1.2.2.2.1: Γενετικές μεταλλαγές που συνδέονται στον οικογενή τύπο της νόσου PD [77].

Υπάρχουν και περιπτώσεις του αυτοσωμικού επικρατή τύπου της νόσου, οι οποίοι έχουν προκληθεί από διπλασιασμούς και τριπλασιασμούς σε περιοχή που περιέχει το γονίδιο της ASYN. Υπάρχει συσχέτιση της ποσότητας του γονιδίου με την εξέλιξη της νόσου, διότι ανάλογα με τους γονιδιακούς διπλασιασμούς και τριπλασιασμούς του γονιδίου, ποικίλλει η ηλικία εμφάνισης και η σοβαρότητα της νόσου [82-84]. Το 95% των περιπτώσεων της νόσου, βέβαια, σχετίζεται με γεγονότα πολυμορφισμού εντός του γονιδίου της ASYN, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ASYN [85].

Σωμάτια Lewy

Στους επιβιώσαντες ντοπανιμεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας παρατηρούνται ενδοκυττάρια έγκλειστα, γνωστά ως σωμάτια Lewy (Lewy bodies), φαινόμενο αντίστοιχο των πλακών του αμυλοειδούς. Τα σωμάτια Lewy αποτελούν τυπικό χαρακτηριστικό της PD, έχουν διάμετρο 5-25 μm και αποτελούνται από έναν ηωσινόφιλο πυρήνα και μια διάφανη περιφερειακή ζώνη.



Εικόνα 1.2.2.2.1: Απεικόνιση σωματίου Lewy στο κυτταρόπλασμα νευρικού κυττάρου της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου (<http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9dPD.html>)

Ο πυρήνας αυτός σχηματίζεται από συσσωματώματα πρωτεϊνών με βασικό δομικό συστατικό τα ινίδια της πρωτεΐνης ASYN [86]. Η ASYN είναι προσυναπτική πρωτεΐνη που συνδέεται με κυστίδια και η λειτουργία της έχει συσχετιστεί με τη μάθηση, την ανάπτυξη και την πλαστικότητα των νευρώνων και τη ρύθμιση σύνθεσης της DA [68, 87]. Η ιδιομορφία των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων συνίσταται στο ότι, ενώ στα σωμάτια Lewy ανιχνεύονται ινίδια ASYN, ανιχνεύονται και κάποια άλλα συστατικά όπως ουβικιτίνη, νευροϊνιδιακές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, το πρόδρομο αμυλοειδές μόριο (APP) και

Αβ πεπτίδια [74, 75]. Είναι πολύ πιθανόν οι αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου να πρέπει να αναζητηθούν στη διαδικασία μετατροπής των πρωτοϊνιδίων σε ινίδια, και όχι στα ινίδια καθ' αυτά.

1.2.2.2.1 Η α- συνουκλεΐνη (α- Synuclein- ASYN).

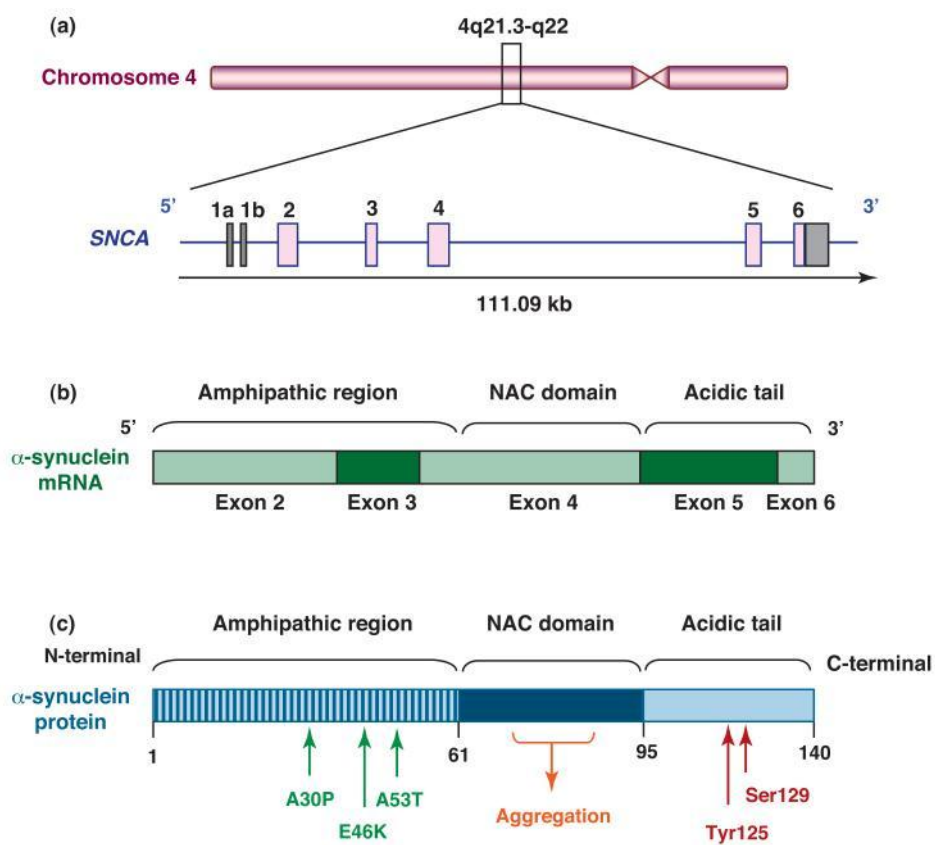
Η ανθρώπινη ASYN κωδικοποιείται από το γονίδιο SNCA και αποτελείται από 140 αμινοξέα [88]. Ανήκει στην οικογένεια των συνουκλεϊνών που είναι αρκετά συντηρημένη και περιλαμβάνει την α-, β-, γ- συνουκλεΐνη, οι οποίες έχουν παρόμοια δομή αλλά κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Τα 3 μέλη της οικογένειας των συνουκλεϊνών έχουν 55- 62% ομολογία στην αλληλουχία τους [89]. Η ASYN του εγκεφάλου αποτελεί το 1% όλων των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος των νευρώνων [90] και εντοπίζεται κυρίως στις απολήξεις των νευρώνων στον εγκεφαλικό φλοιό, τον ιππόκαμπο, τη μέλαινα ουσία [91] καθώς και σε μικρότερο βαθμό στα ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια και κύτταρα γλοίας [92]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ASYN είναι μια διαλυτή και μεμβρανο- συνδεόμενη πρωτεΐνη με τυχαία διαμόρφωση, η οποία μετασχηματίζεται σταδιακά σε ενδιάμεσα πρωτοϊνίδια. Στα πρωτοϊνίδια αυτά, παρατηρούνται αυξημένες β-πτυχωτές επιφάνειες, με αποτέλεσμα, την αλλαγή της τεταρτοταγούς δομής της πρωτεΐνης [68, 87]. Ο ρόλος της ASYN δεν είναι πλήρως κατανοητός, ωστόσο έχει χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνη των προσυναπτικών απολήξεων των νευρώνων. Έχει προταθεί ότι συμμετέχει στη διατήρηση της προμήθειας κυστιδίων στα προσυναπτικά άκρα μέσω σύνδεσής της στα κυστίδια [93]. Συγκεκριμένα συνδέεται σε λιπιδικές μεμβράνες μέσω των αμινοτελικών επαναλήψεων της. Επίσης, έχει προταθεί πως έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τις διαδικασίες μεταφοράς των κυστιδίων, διότι αναστέλλει επιλεκτικά το ένζυμο Φωσφολιπάση- D που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και πιθανώς, συμμετέχει σε μονοπάτια σηματοδότησης για τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και της ενδοκυττάρωσης [89]. Υπάρχουν ενδείξεις πως η ASYN συμμετέχει στη ρύθμιση απελευθέρωσης και της ομοιόστασης του νευροδιαβιβαστή DA εντός του κυτταροπλάσματος. Όμως, απενεργοποίηση του γονιδίου μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού δεν οδηγεί σε σοβαρό νευρολογικό φαινότυπο και άρα η απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου της ASYN δεν δίνει στοιχεία για το ρόλο της στο νευροεκφυλισμό. Παρ' όλα αυτά, σε μύες που δεν παράγεται ASYN παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα της DA που εκκρίνεται από το ραβδωτό σώμα. Βάσει των στοιχείων αυτών, προτείνεται ότι η ASYN μπορεί να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της νευροδιαβίβασης στο ραβδωτό σώμα, ακόμη και της βιοσύνθεσης της DA, μέσω αλληλεπίδρασης με την υδροξυλάση της τυροσίνης και τη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου [94]. Τέλος, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της μάθησης, της ανάπτυξης και της πλαστικότητας των νευρώνων [68].

Σε υδατικό διάλυμα η ASYN βρίσκεται σε αποδιαταγμένη μορφή και για το λόγο αυτό θεωρείται τυπικό παράδειγμα εγγενώς μη πτυχωμένης πρωτεΐνης. Στο κυτταρόπλασμα θεωρείται ότι βρίσκεται σε αποδιαταγμένη μορφή [92], αν και μπορεί να υφίσταται και ως τετραμερές [95]. Όταν η πρωτεΐνη δεν ολιγομερίζεται απουσιάζουν οι β- δομές [68], ενώ θεωρείται ότι αποκτά δομή α- έλικας όταν συνδέεται με φωσφολιπιδικές επιφάνειες ή συνθετικές λιπιδικές μεμβράνες [96].

Ελλείψεις τόσο στο αμινοτελικό άκρο, όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο, οδηγούν σε αύξηση της ινιδιακής μορφής της ASYN [97]. Τα αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου αποτελούν θέσεις για τις περισσότερες μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται η ASYN. Παρά το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση του καταλοίπου της σερίνης 129 δε συμμετέχει στον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης, αποτελεί όμως μία από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες τροποποιήσεις της παθολογικής ASYN [98].

Το γονίδιο της ASYN

Το γονίδιο της ανθρώπινης ASYN, όπως προαναφέρθηκε, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4 στην 4q21-q22 περιοχή [99]. Το αμινοτελικό κωδικοποιείται από τα εξώνια 3 και 4 του γονιδίου SNCA. Η κεντρική NAC περιοχή κωδικοποιείται από το εξώνιο 5 και το καρβοξυτελικό όξινο άκρο κωδικοποιείται από τα εξώνια 6 και 7 [100]. Τρεις ισομορφές της ASYN παράγονται μέσω εναλλακτικής συρραφής: Η πλήρους μήκους (140 αμινοξέων), η ASYN- 126 χωρίς τα κατάλοιπα 41-54 λόγω απώλειας του εξωνίου 3 και η ASYN- 112 από την οποία απουσιάζουν τα κατάλοιπα 103- 130 λόγω απώλειας του εξωνίου 5 [101]. Μεταλλαγές του γονιδίου εντοπίζονται σε μερικές σπάνιες περιπτώσεις της οικογενούς μορφής της νόσου. Μέχρι στιγμής, έχουν χαρακτηριστεί πέντε σημειακές μεταλλάξεις A53T, A30P, E46K, H50Q, G51D. Κάποιες από αυτές επηρεάζουν τη διαδικασία της συσσώρευσης της ASYN σε συσσωματώματα [102].



Εικόνα 1.2.2.2.1: Σχηματική αναπαράσταση της ανθρώπινης ASYN, από το γονίδιο στην πρωτεΐνη

Έχει αναφερθεί ότι η συσσώρευση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια στον εγκέφαλο, είναι το κοινό χαρακτηριστικό όλων των νευροεκφυλιστικών μηχανισμών. Τα συσσωματώματα είναι ικανά να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες συνεισφέροντας στη μετάδοση της παθολογίας των νευροεκφυλιστικών μηχανισμών. Τα συσσωματώματα προκύπτουν είτε από λανθασμένη πτύχωση της νέο- συντιθέμενης πρωτεΐνης, είτε από μετέπειτα τροποποίηση της διαμόρφωσής του. Οι πρωτεΐνες με λάθος ή ατελή πτύχωση, εκθέτουν στην εξωτερική επιφάνειά τους τις πλευρικές υδρόφοβες αμινοξικές αλυσίδες, οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται στο εσωτερικό [103]. Η τροποποιημένη αυτή διάταξη έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση τους σε διμερή, τριμερή και ολιγομερή. Οι δομές αυτές λειτουργούν ως πόλος έλξης άλλων μονομερών στα άκρα τους, καταλήγοντας σε δομές υψηλής οργάνωσης, τα ολιγομερή και τα πρωτοϊνίδια και τέλος σε ινίδια του αμυλοειδούς. Οι δομές αυτές μπορεί να γίνουν τοξικές. Η παθολογία αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί και ως παθολογία Prion όταν υπάρχουν ισχυρές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών μορίων, στην περίπτωση που η συσσωμάτωση είναι μη αντιστρεπτή, στην περίπτωση που υπάρχει ισχυρή αντίσταση στους κυτταρικούς μηχανισμούς εξάλειψής της ή αν μεταδίδεται από κύτταρο σε

κύτταρο, στρατολογώντας τα μονομερή σε συσσωμάτωση [103]. Η μετατροπή της φυσιολογικής ASYN στην ινιδιακή μορφή της, προϋποθέτει αύξηση των β- δομών της πρωτεΐνης και αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή της [68]. Τα πρωτοϊνίδια είναι πλούσια σε β- δομές και μπορούν να υπάρξουν σε σφαιρικές δομές, επιμήκεις αλυσίδες ή μορφές που προσομοιάζουν σε δαχτυλίδια. Η διαφορά των πρωτοϊνιδίων από τα μονομερή και τα ινίδια, έγκειται στο ότι μπορεί να σχηματίζουν τοξικές δομές, ικανές να διαπεράσουν λιπιδικά κυστίδια ή οργανίδια. Το γεγονός αυτό, πιθανόν να συμβάλλει στην τοξικότητα, μέσω λανθασμένης ανακατανομής του περιεχομένου των δομών αυτών. Οι ολιγομερείς μορφές της ASYN είναι οι πλέον τοξικές μορφές και ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τις νευροτοξικές συνέπειες της νόσου [104]. Είναι πιθανό, οι τοξικές αυτές δομές να μη δημιουργούνται μόνο μεταξύ των κυτταρικών σωμάτων των νευρώνων, αλλά και με τη συμμετοχή των αξόνων, στους οποίους τα συσσωματώματα είναι ικανά να μετακινούνται από και προς το σώμα [103].

Μετάδοση της νόσου

Ό, τι αφορά τη σειρά μετάδοσης της νόσου, έχει προταθεί πως σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα από την εμφάνιση των συμπτωμάτων, επηρεάζονται οι οσφρητικοί λοβοί του εγκεφάλου και το εγκεφαλικό στέλεχος. Η παθολογία αργεί αρκετά χρόνια να μεταδοθεί στη μέλαινα ουσία του μεσεγκεφάλου, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση εμφάνισης κινητικών συμπτωμάτων [105]. Επιπλέον, στην τάση ολιγομερισμού της πρωτεΐνης, συμβάλλουν και μια σειρά από μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως νιτροζυλίωση, οξειδωση, γλυκοζυλίωση και φωσφορυλίωση [95]. Έχει δειχθεί επίσης, ότι η διάσπαση του καρβοξυτελικού άκρου της ASYN αλλά και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως ύπαρξη βαρέων μετάλλων, επάγουν την τάση για ολιγομερισμό και συσσωμάτωση της ASYN [106]. Τέλος, έχει προταθεί πως στη δημιουργία ολιγομερών μορφών ASYN συμβάλλει ο νευροδιαβιβαστής DA, καθώς σταθεροποιεί τις ολιγομερείς μορφές στο στάδιο των τοξικών πρωτοϊνιδίων αποτρέποντας τη μετατροπή τους σε ινίδια [107, 108].

Συνεπώς, τα συμπτώματα που εμφανίζονται στους ασθενείς με PD μπορεί να οφείλονται στη διαδικασία μετατροπής των πρωτοϊνιδίων σε ινίδια ASYN και ως εκ τούτου, την απώλεια της λειτουργίας της.

1.3 Η αποκαρβοξυλάση της L-DOPA (L- DOPA decarboxylase- DDC).

Το ένζυμο L-DOPA αποκαρβοξυλάση (DDC) (L-3,4 διυδροξυφαινυλαλανίνη) ανακαλύφθηκε το 1938 σε εκχύλισμα από νεφρό χοίρου. Αποτέλεσε το πρώτο ένζυμο που μελετήθηκε στο βιοχημικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης κατεχολαμινών στα θηλαστικά. Ανήκει στην α-οικογένεια των αμινοτρανσφερασών, συγκεκριμένα στην υποομάδα II των α-αποκαρβοξυλασών. Βρίσκεται σε όλα τα αμινεργικά κύτταρα στα κεντρικά και περιφερειακά νευροδιαβιβαστικά συστήματα. Έχει επίσης εντοπιστεί σε περιφερειακά όργανα όπως το συκώτι, νεφρά και πάγκρεας [109-111]. Όσον αφορά τη σημασία της DDC έχει προταθεί ότι η αύξηση της ενζυμικής της ενεργότητας που έχει παρατηρηθεί σε συγκεκριμένους τύπους όγκων, έχει οδηγήσει τους ερευνητές να προτείνουν ότι το ένζυμο θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα μόριο στόχο για τη δράση ενζυμικά ενεργοποιημένων κυτταροτοξικών παραγόντων. Γενικώς έχει προταθεί ότι συμμετέχει στην παθολογία νεοπλαστικών, νευρολογικών και ψυχιατρικών ασθενειών [112]. Η δράση του ενζύμου είναι ευρεία:

- 1) Καταλύει τη μετατροπή της L-Dopa σε DA
- 2) Μετατρέπει την L-5-υδροξυτρυπτοφάνη σε σεροτονίνη
- 3) Μετατρέπει άλλα αρωματικά αμινοξέα όπως η p-τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη στις αντίστοιχες αρωματικές αμίνες τους.

Η DA και η σεροτονίνη δρουν ως νευροδιαβιβαστές και μπορούν να επηρεάσουν τη διάθεση, την ψυχολογική και φυσιολογική ομοιόσταση και τον κινητικό συντονισμό. Αλλαγή στη συγκέντρωση της DA αποτελεί την αιτία δημιουργίας νευροεκφυλιστικών νόσων όπως η νόσος PD [113].

Η διαδικασία σύνθεσης της DA που πραγματοποιείται στα νευρικά κύτταρα αποτελείται από δύο βασικά βήματα με την L-DOPA αποκαρβοξυλάση, να καταλύει το δεύτερο από αυτά:

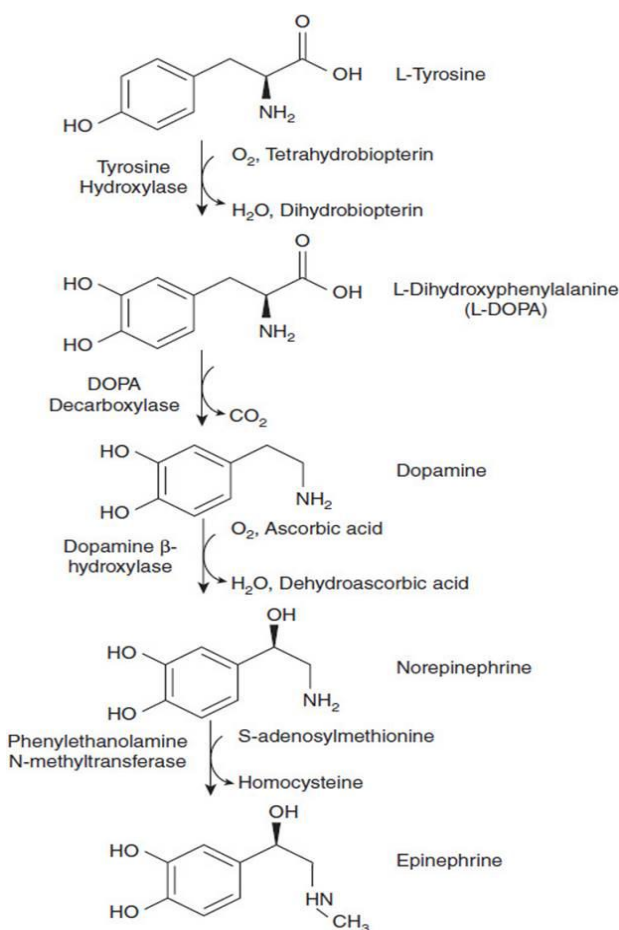
1. Η υδροξυλίωση του αμινοξέος τυροσίνη σε L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA) η οποία καταλύεται από την υδροξυλάση της τυροσίνης ή TH. Το ένζυμο χρησιμοποιεί ως συμπράγοντες το μοριακό οξυγόνο (O_2), το σίδηρο (Fe^{2+}) και την τετραϋδροβιοπτερίνη. Το βήμα αυτό αποτελεί ένα στάδιο περιορισμού της ταχύτητας της αντίδρασης [114, 115].
2. Η μετατροπή της L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνης (L-DOPA) σε DA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την L-DOPA αποκαρβοξυλάση (L-DOPA decarboxylase ή DDC). Το ένζυμο χρησιμοποιεί ως συμπράγοντα την πυριδοξαλική φωσφατάση (5-pyridoxal phosphate, PLP), την

ενεργή μορφή της βιταμίνης B6 (Human Metabolome database Retrieved 17 February 2015 για την AADC).

Η βιοσύνθεση των κατεχολαμινών ολοκληρώνεται με δύο επιπλέον βήματα που οδηγούν στην παραγωγή επινεφρίνης και νορεπινεφρίνης και είναι :

I. Η σύνθεση νορεπινεφρίνης από DA: Η αντίδραση πραγματοποιείται με υδροξυλίωση της DA που καταλύεται από το ένζυμο β-υδροξυλάση της DA (DBH). Το ένζυμο χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο (O_2) και ασκορβικό οξύ ως συμπαραγόντες.

II. Η σύνθεση επινεφρίνης από νορεπινεφρίνη: Η αντίδραση πραγματοποιείται με μεταφορά μεθυλικής ρίζας από το ένζυμο N-μεθυλοτρανσφεράση της φαινυλαιθανολαμίνης (PNMT). Το ένζυμο χρησιμοποιεί S-αδενοσυλο -L-μεθειονίνη ως συμπαραγόντα.



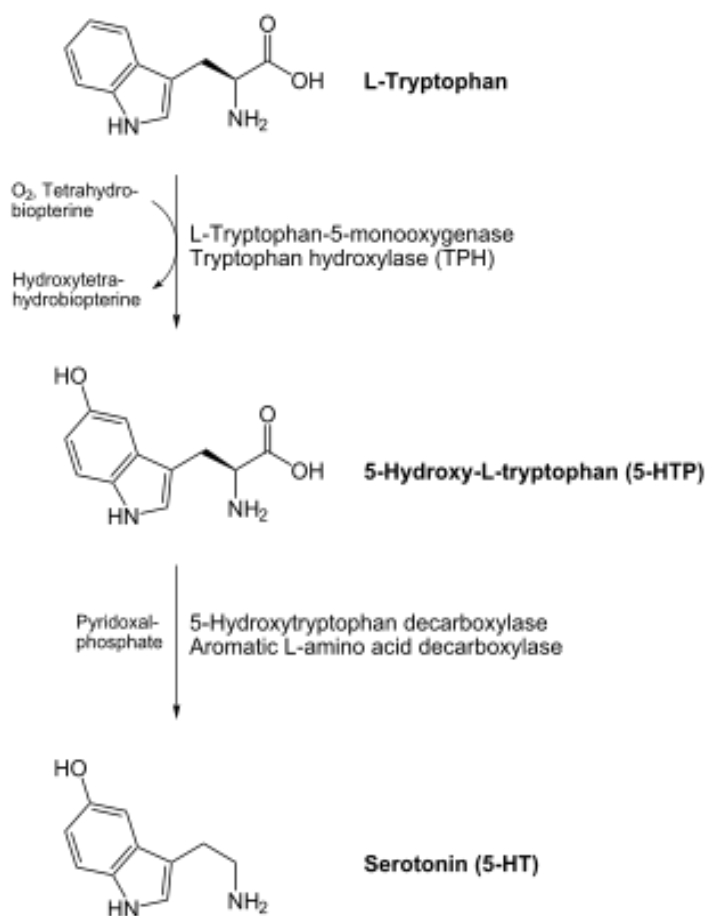
Εικόνα 1.3.1 :Βιοχημικό μοναπάτι βιοσύνθεσης κατεχολαμινών

Η L-DOPA αποκαρβοξυλάση συμμετέχει και σε ένα δεύτερο μονοπάτι βιοσύνθεσης, (DDC) το οποίο είναι το μονοπάτι βιοσύνθεσης σεροτονίνης (5-υδροξυτρυπταμίνη 5-HT). Το ένζυμο καταλύει την αντίδραση μετατροπής της L-5-υδροξυτρυπτοφάνης σε σεροτονίνη.

Η μεταβολική οδός περιλαμβάνει :

1.Υδροξυλίωση της τρυπτοφάνης σε 5-υδροξυ-τρυπτοφάνη από το ένζυμο υδροξυλάση της τρυπτοφάνης (TPH), χρησιμοποιώντας ως συμπράγοντα την τετραϋδροβιοπτερίνη.

2. Αποκαρβοξυλίωση της 5-υδροξυτρυπτοφάνης (5-HTP) σε 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT) από το ένζυμο L-DOPA αποκαρβοξυλάση (DDC).



Εικόνα 1.3.2 :Βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης σεροτονίνης

Η L-DOPA αποκαρβοξυλάση συμμετέχει και σε ένα τρίτο μονοπάτι βιοσύνθεσης, το οποίο είναι η παραγωγή αμινών από τα αρωματικά L-αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη. Οι αμίνες που παράγονται έχει προταθεί ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της νευροδιαβιβαστικής λειτουργίας στο

κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Για τους λόγους αυτούς έχει προταθεί η ονομασία του ενζύμου ως Αποκαρβοξυλάση Αρωματικών L-Αμινοξέων (Aromatic L-Amino acid Decarboxylase ή AAADC) [113].

1.3.1 Η Δομή της DDC.

Η L-DOPA αποκαρβοξυλάση (DDC) απομονώθηκε πρώτη φορά από νεφρό χοίρου [116] και στη συνέχεια από ήπαρ [117], φαιοχρωμοκύττωμα [117] και νεφρό αρουραίου [118], από εγκέφαλο [119], μυελό επινεφριδίων [120], νεφρό [121] και ραβδωτή μοίρα εγκεφάλου βοός [122], ανθρώπινο φαιοχρωμοκύττωμα [123]. Αρχικά, το ένζυμο είχε χαρακτηριστεί ως ετεροδιμερές μόριο ωστόσο, με μεταγενέστερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα έντομα *Drosophila melanogaster* [124] και *Ceratitis capitata* [121] αποδείχθηκε ότι το ένζυμο είναι ομοδιμερές και αποτελείται από δύο υπομονάδες με μοριακή μάζα 54.000 Da και 48.000 Da αντίστοιχα. Η μοριακή μάζα του ενζύμου που απομονώθηκε από ανθρώπινο φαιοχρωμοκύττωμα [123, 125] και νεφρό [121] προσδιορίστηκε γύρω στα 50.000 Da, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Σήμερα θεωρείται ότι αποτελεί ένα ομοδιμερές με μοριακή μάζα υπομονάδας 50.000-55.000 Da κάτι που επιβεβαιώνεται και από κρυσταλλογραφικές μελέτες στην ανασυνδυασμένη ενζυμική πρωτεΐνη [126]. Το ομοδιμερές ένζυμο έχει την τυπική δομή της α-οικογένειας των πυριδοξαλικών 5'φωσφορικών (PLP)-εξαρτώμενων ενζύμων. Κάθε υπομονάδα διακρίνεται από τρεις περιοχές και σε κάθε μία προσδένεται ένα PLP μόριο [119, 121, 123, 127].

Πρωτοταγής δομή: Η αμινοξική αλληλουχία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης αναφέρεται ως πρωτοταγής δομή. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα της L-DOPA αποκαρβοξυλάσης συντίθεται από 486 αμινοξέα, με αποτέλεσμα την απόκτηση τριτοταγούς δομής. Η ολοκληρωμένη αμινοξική αλληλουχία καθορίστηκε το 1991 με πεπτιδική ανάλυση, αυξάνοντας την κατανόηση για τη δομή και τη λειτουργία του ενζύμου [127]. Δευτεροταγής δομή: Η δόμηση δευτεροταγών δομικών στοιχείων όπως α-έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες προκύπτουν λόγω ανάπτυξης υδροφοβικότητας καθώς και λόγω της ανάγκης ουδετεροποίησης των βασικών πολικών ομάδων της κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα της DOPA αποκαρβοξυλάσης συντίθεται από επτά κλώνους β-πτυχωτής επιφάνειας, μιας τετράκλωνης αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας, πολλαπλές α-έλικες και άλλα δευτεροταγή δομικά στοιχεία όπως θηλιές και εκτεταμένους κλώνους. Άλλη κοινή δευτεροταγής δομή είναι η β-στροφή ή αντίστροφη στροφή [128]. Τριτοταγής δομή: Στο επίπεδο αυτό η πολυπεπτιδική αλυσίδα αποκτά τρισδιάστατη δομή στο χώρο. Οι βασικές μονάδες που απαρτίζουν την τριτοταγή δομή ονομάζονται περιοχές. Κάθε ένα από τα δύο μονομερή της L-DOPA αποκαρβοξυλάσης απαρτίζεται από τρεις

διακριτές περιοχές. Η μεγάλη περιοχή περιλαμβάνει το κέντρο πρόσδεσης του συμπαραγόντα PLP και αποτελείται από β-πτυχωτή επιφάνεια 7 κλώνων που περιβάλλεται από οκτώ α-έλικες με αποτέλεσμα τη δομή α/β πτύχωσης. Η μικρή καρβοξυτελική περιοχή (C-τελική) αποτελείται από τέσσερις κλώνους αντιπαράλληλων β-πτυχωτών δομών με τρεις α-έλικες αντιδιαμετρικά της μεγάλης περιοχής. Οι προαναφερθέντες περιοχές είναι κοινές σε όλα τα μέλη της οικογένειας των PLP-εξαρτώμενων ενζύμων. Αντιθέτως, η αμινοτελική περιοχή (N-τελική) είναι μοναδική για την DOPA αποκαρβοξυλάση (Κατάλοιπα 1-85). Αποτελείται από δύο παράλληλες α-έλικες συνδεόμενες από έναν εκτεταμένο κλώνο. Αυτή η δομή ακουμπά στην κορυφή της δεύτερης υπομονάδας και είναι αντιπαράλληλη με την αντίστοιχη έλικα της. Επίσης, κατάλοιπα (75-77 και 433-435) της αμινοτελικής περιοχής καθώς και της μικρής περιοχής δομούν μία μικρή δίκλωνη β-πτυχωτή περιοχή [126]. Τεταρτοταγής δομή: Υπάρχουν μόνο ορισμένες ενδείξεις για την τεταρτοταγή δομή του ενζύμου. Το επίπεδο της δομής αυτής υφίσταται μόνο σε σύμπλοκα πολλών υπομονάδων. Η DDC έχει το ενεργό της κέντρο τοποθετημένο κοντά στο σημείο αλληλεπίδρασης των δύο μονομερών. Εφόσον η N-τελική περιοχή του ενός μονομερούς βρίσκεται πάνω στο άλλο μονομερές σχηματίζεται μια εκτεταμένη διεπαφή. Το επίπεδο τεταρτοταγούς δομής είναι περισσότερο σταθερό μόνο στη διμερή μορφή του ενζύμου [129].

Στις κρυσταλλικές δομές της DDC, μια μικρή περιοχή 11 αμινοξέων (κατάλοιπα 328–339) είναι μη εντοπίσιμη στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας. Η περιοχή που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 327–354 και 328–339 λείπει τόσο στην ανθρώπινη ισομορφή όσο και στην ολομορφή του χοίρου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την παρουσία μιας ευέλικτης θηλειάς. Η θηλειά περιέχει ένα σημαντικό συντηρημένο κατάλοιπο την Tyr-332 [126], η οποία πιθανόν σχετίζεται με την ευαισθησία σε πρωτεάσες [130].

Η ανασυνδυασμένη μορφή της DDC από την οποία λείπει η συγκεκριμένη θηλειά, έχει δειχθεί ότι είναι καταλυτικά ανενεργή. Έχει βρεθεί ότι αυτά τα κατάλοιπα είναι επιρρεπή στην αποικοδόμησή τους από πρωτεάσες όταν η DDC δεν αλληλεπιδρά με τον προσδέτη, ενώ δεν αποικοδομούνται όταν δημιουργείται το σύμπλοκο αναστολής με L-DOPA μεθυλεστέρα [131]. Η θηλειά είναι τοποθετημένη στην διεπαφή των δύο μονομερών και πιθανόν επεκτείνεται προς το ενεργό κέντρο του άλλου μονομερούς σε κλειστή διαμόρφωση. Σε αυτή τη διαμόρφωση θα μπορούσε να πάρει μέρος στον καταλυτικό μηχανισμό μέσω καταλοίπων της τα οποία είναι υψηλά συντηρημένα όπως τα Tyr 332, Lys ή Arg 334 στις περισσότερες PLP-εξαρτώμενες αποκαρβοξυλάσες, που βρίσκονται στη μέση της θηλειάς και σε κλειστή διαμόρφωση προσεγγίζουν το ενεργό κέντρο. Κατά τη διάρκεια της κατάλυσης αυτή η θηλειά αναμένεται να υιοθετήσει μια λιγότερο ευαίσθητη σε πρωτεάσες διαμόρφωση. Έχει βρεθεί ότι η υποκατάσταση του καταλοίπου Tyr 332 οδηγεί σε καταλυτικά ανενεργό ένζυμο [132]. Αυτό το γεγονός, υποδεικνύει τη σημασία του συγκεκριμένου καταλοίπου στην καταλυτική ενεργότητα της DDC.

Στην ολομορφή του ενζύμου, το ενεργό κέντρο είναι κρυμμένο στο κεντρικό κομμάτι του διμερούς [133]. Μέσω μελετών κρυσταλλογραφίας του ολοενζύμου και αποενζύμου με ακτίνες Χ, έγινε σύγκριση του ανθρώπινου αποενζύμου με το πιο κοντινό ορθόλογο ολοένζυμο από νεφρούς χοίρου (89% ομοιότητα αλληλουχίας). Βρέθηκε πως η διαμόρφωση του αποενζύμου είναι εντελώς ανοιχτή με τις δύο μεγάλες υπομονάδες να μετακινούνται μέχρι τα 20 Å σε σχέση με το ολοένζυμο. Αυτή η ανοιχτή διαμόρφωση επιτυγχάνεται μέσω τεταρτοταγούς αναδιάταξης του διμερούς. Η επιφάνεια του διμερούς της ανοιχτής διαμόρφωσης περιλαμβάνει μόνο τις έλικες της N-περιοχής. Επίσης έχειδειχθεί, ότι το αποένζυμο αποικοδομείται πιο γρήγορα από το ολοένζυμο σε εγκεφαλικά κύτταρα αρουραίου [134]. Πράγματι, η αποικοδόμηση για την από- DDC πραγματοποιείται από το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (UPS) [135]. Συγκεκριμένα, λιγότερες της ουβικιτίνης αναγνωρίζουν τις αποδομημένες ζώνες της πρωτεΐνης στόχου ή και νέο-εκτεθειμένες επιφάνειες. Η ανοιχτή διαμόρφωση της ανθρώπινης απομορφής DDC, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της εκτεθειμένης επιφάνειας στο διαλυτικό μέσο, την έκθεση του ενεργού κέντρου, καθώς και ένα μεγάλο μέρος της επιφάνειας του διμερούς. Επίσης, τρεις σημαντικές θηλειές αποσταθεροποιούνται και ο όγκος και το σχήμα του ενζύμου αλλάζουν.

1.3.2 Παράγοντες που ρυθμίζουν την ενεργότητα της DDC.

Η βιοχημεία του ενζύμου DDC και η καταλυτική ενεργότητα του βασίζεται στα χαρακτηριστικά του συνενζύμου του 5-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Ο συμπαράγοντας είναι ικανός να συμμετέχει σε ποικίλες αντιδράσεις εκτός της αποκαρβοξυλίωσης, όπως η οξειδωτική απαμίνωση, τρανσαμίνωση και κυκλοποίηση. Η ανάλυση της δομής του ενζύμου δείχνει ότι έχει μια διμερή διάταξη και σε συνδυασμό με μελέτες της κινητικής του ενζύμου, παρέχει τη μοριακή βάση για την αναγνώριση των καταλοίπων που συμμετέχουν σε κάθε καταλυτική ενεργότητα. Έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια για το σχεδιασμό αποτελεσματικών και ειδικών αναστολέων επί προσθήκη αυτών που ήδη χρησιμοποιούνται για θεραπεία που δεν έχουν υψηλή εξειδίκευση και είναι υπεύθυνοι για παρενέργειες που προκύπτουν από την έλλειψη του ενζύμου [113].

Το ενεργό κέντρο της DDC είναι τοποθετημένο σε μια σχισμή στη διεπαφή μεταξύ των δύο υπομονάδων του διμερούς όπως συμβαίνει σε όλα τα PLP-εξαρτώμενα ένζυμα της οικογένειας ασπαρτικών αμινοτρανσφερασών. Αυτό συντίθεται κυρίως από κατάλοιπα του ενός από τα δύο μονομερή αλλά για τη σύνδεση του συμπαράγοντα συμμετέχουν κατάλοιπα και από τις δύο περιοχές και των δύο υπομονάδων εφόσον το ενεργό κέντρο βρίσκεται στη διεπαφή τους. Το ενεργό κέντρο

συντίθεται από πολλά κατάλοιπα κλειδιά. Η οργάνωση της σχισμής πρόσδεσης του PLP γίνεται από κάποια σημαντικά συντηρημένα κατάλοιπα. Η αμινομάδα του καταλοίπου λυσίνης, Lys-303 συνδέεται ομοιοπολικά με τη φορμυλομάδα του PLP απουσία του υποστρώματος και σχηματίζει τη βάση του Schiff. Το κατάλοιπο ασπαργίνης, Asp-271 δημιουργεί γέφυρα άλατος με την το PLP για μεγαλύτερη σταθεροποίηση του ενδιάμεσου συμπλόκου [136]. Ουσιαστικά η γέφυρα άλατος συνδυάζει δεσμούς υδρογόνου και ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση (μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις). Δύο μόρια PLP προσδένονται ανά ομοδιμερές ένζυμο. Το PLP συνδέεται περισσότερο σταθερά στην πρωτεΐνη μέσω ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου [129]. Το κατάλοιπο της ιστιδίνης, His-192 αποτελεί μια πυριδίνη που αλληλεπιδρά με τον αρωματικό δακτύλιο του PLP. Ένα επιπλέον δίκτυο καταλοίπων : Ser-147, Ser-149, Asn-300, His-302 και Phe-309, συνεισφέρει στην αλληλεπίδραση με δεσμούς υδρογόνου με το PLP και σταθεροποιεί τη φωσφορική του ομάδα. Επιπλέον, τα κατάλοιπα Ile-1010 και Phe-1030 της γειτονικής υπομονάδας όπως και τα Trp-71, Tyr-79, Phe-80, Thr-82 εμπλέκονται στην πρόσδεση του υποστρώματος αλλά και στη σταθεροποίηση του συμπαραγόντα. Τέλος, το κατάλοιπο Thr-246, προτείνεται ότι συμμετέχει στον καταλυτικό μηχανισμό [136].

Διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι η ενζυμική ενεργότητα της DDC που έχει απομονωθεί από ανθρώπινο νεφρικό ιστό και από ραβδωτό εγκεφάλου βοός αναστέλλεται παρουσία συγκεκριμένων ιόντων Cu_{2+} , Zn_{2+} , Hg_{2+} (141). Τα ίδια κατιόντα δεν επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου που απομονώνεται από τις ωοθήκες του εντόμου *Aedes aegypti* και από τη λευκή νύμφη του εντόμου *Ceratitis capitata*. Τα ιόντα ασβεστίου (Ca_{+2}) φαίνεται ότι επηρεάζουν το μηχανισμό ρύθμισης της ενεργότητας της DDC. Υψηλά επίπεδα ασβεστίου αυξάνουν την ενεργότητα της DDC. Αντιθέτως, χαμηλά επίπεδα ασβεστίου ή απουσία ασβεστίου δεν έχουν καμία επίδραση στην ενεργότητα της DDC [121].

Όπως υποστηρίζεται από πολλές βιβλιογραφικές μελέτες, το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη ενεργότητα σε εύρος pH από 6.0 έως 8.2 και το pH φαίνεται πως επηρεάζει την ενζυμική ενεργότητα [137-139].

Η DDC αναστέλλεται από πολλούς παράγοντες. Κάποιες από αυτές είναι η carbidopa, η οποία χορηγείται παράλληλα με την L-DOPA ως θεραπευτικό μέσο της νόσου PD, το L-3-(3,4 διυδροξυφαινυλ)-2-υδραζιν-μεθυλπροπιονικό οξύ (α -MDH) που είναι συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου, η 3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνη (NSD-1015) [140] και η α -μονο-φλουορο-μεθυλ- Dopa (MFMD) [141]. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες, που περιέχει το πράσινο τσάι, αναστέλλουν μη αντιστρεπτά την ενεργότητα της DDC [142]. Τέλος, η ουσία βενσεραζίδη διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και αναστέλλει την ενεργότητα της DDC στο ραβδωτό σώμα εγκεφάλου αρουραίου [143], ενώ η α -μεθυλ- Dopa (AMD) απενεργοποιεί το ένζυμο [144].

1.3.3 Το γονίδιο της DDC.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της DDC της *Drosophila* διατυπώθηκε το 1986 [145]. Η δημιουργία cDNA κλώνων της DDC πραγματοποιήθηκε πρωταρχικά από επινεφρίδιο βοός [120] και μεταγενέστερα απομονώθηκαν cDNA κλώνοι χρησιμοποιώντας ιστό από ανθρώπινο φαιοχρωμοκύττωμα, νεφρό, φαιοχρωμοκύττωμα και ήπαρ αρουραίου, μυελό επινεφριδίων βοός και ανθρώπινο πλακούντα. Μέσω σύγκρισης των αλληλουχιών αυτών των κλώνων αποδείχθηκε ότι οι αλληλουχίες της DDC είναι υψηλά συντηρημένες ανάμεσα στα είδη. Η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της ανθρώπινης DDC βρέθηκε χρησιμοποιώντας κύτταρα νευρικής και μη νευρικής προέλευσης όπως φαιοχρωματικά, ηπατικά, πλακουντικά, περιφερειακά λευκοκύτταρα [146-150], αλλά και από άλλες κυτταρικές σειρές όπως U937 μακροφάγα [151] SH-SY5Y κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος, HTB-14 και HeLa κυτταρικές σειρές [152]. Υψηλή συντήρηση μεταξύ των ειδών παρατηρείται και όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία της DDC. Ιδιαίτερης σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι η αλληλουχία NFNPWK που αντιστοιχεί στη θέση δέσμευσης της 5-φωσφορικής πυριδοξάλης, είναι ίδια σε όλους τους οργανισμούς [153].

Το γονίδιο της DDC έχει εντοπιστεί με πειράματα υβριδοποίησης στο χρωμόσωμα 7 συγκεκριμένα στη ζώνη p12.1-12.3 [154]. Με αντίστοιχα πειράματα υβριδοποίησης οι Scherer και οι συνεργάτες είχαν εντοπίσει το γονίδιο στο χρωμόσωμα 7, στη θέση p11 [150]. Ένα μόνο γονίδιο κωδικοποιεί την DDC που υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο στο απλοειδές γονιδίωμα [147] και το μέγεθός του είναι 85kb. Το ανθρώπινο γονίδιο της DDC αποτελείται από 15 εξώνια των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 20 bp και 400 bp και 14 ιντρόνια των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 927 και 24077 bp [147, 155]. Σημειώνεται ότι το εξώνιο 1 ανήκει στην 5-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου και δεν οδηγεί σε κωδικοποίηση αμινοξέων. Η μεταγραφή του γονιδίου είχε προταθεί ότι ξεκινάει στη θέση -111 με την αρίθμηση +1 να αποδίδεται στην αδερίνη του κωδικονίου έναρξης ATG [147]. Στη συνέχεια όμως η παρατήρηση αυτή αμφισβητήθηκε καθώς το σημείο έναρξης της μεταγραφής εντοπίστηκε 13-23 bp downstream του γονιδίου [148].

Η σύγκριση των cDNA σε ηπάτωμα και φαιοχρωμοκύττωμα παρουσίαζε διαφορές στις 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές παρόλο που οι κωδικοποιούσες πρωτεΐνες ήταν ταυτόσημες. Αργότερα, όταν απομονώθηκε το cDNA από ανθρώπινο ήπαρ διαπιστώθηκε πως η αλληλουχία του ήταν ταυτόσημη με την αντίστοιχη αλληλουχία του φαιοχρωμοκυττώματος με τη μόνη διαφορά στο μεγαλύτερο τμήμα της 5' αμετάφραστης περιοχής (5'-UTR). Ένα μόνο γονίδιο κωδικοποιεί την DDC τόσο στο νευρικό όσο και στο μη νευρικό ιστό, ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει ένας μηχανισμός ιστοειδικής έκφρασης

ανάλογα με τον ιστό που εκφράζεται το γονίδιο, ο οποίος ελέγχεται από δύο διακριτούς υποκινητές και περιλαμβάνει γεγονότα εναλλακτικής συρραφής στην 5-αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR) του mRNA της DDC. Με άλλα λόγια, τα δύο εναλλακτικά DDC μετάγραφα μοιράζονται παρόμοιες κωδικές περιοχές και έχει διατυπωθεί ότι η παραγωγή τους είναι γεγονός εναλλακτικού ματίσματος και χρήσης εναλλακτικού υποκινητή [148, 156]. Το μετάγραφο νευρικού τύπου περιλαμβάνει το εξώνιο N₁ (83 bps) που βρίσκεται καταρροϊκά του νευρικού υποκινητή, τοποθετείται 17.8 kbs αναρροϊκά του δεύτερου εξωνίου. Το mRNA του μη νευρικού τύπου φέρει το εξώνιο L₁ (200 bps), τοποθετείται καταρροϊκά του μη νευρικού υποκινητή και 4.2 kbs αναρροϊκά του εξωνίου N₁. Το δεύτερο εξώνιο περιέχει το σημείο έναρξης της μετάφρασης και τοποθετείται καταρροϊκά του μη νευρικού εξωνίου (L₁) κατά 22 kbs. Η θέση έναρξης της μεταγραφής για το εξώνιο μη νευρικού τύπου προσδιορίστηκε στη G της θέσης -228 [148].

Όσον αφορά το νευρωνικό υποκινητή της DDC αναγνωρίζονται αρκετές αλληλουχίες από τις HNF και τις ΡΟΥ οικογένειες πρωτεϊνών. Επίσης, εφόσον το γονίδιο της DDC τοποθετείται κοντά στην ομάδα εντυπωμένων γονιδίων, η έκφρασή του μπορεί να θεωρηθεί ότι ελέγχεται αυστηρά από επιγενετικές ρυθμίσεις [157].

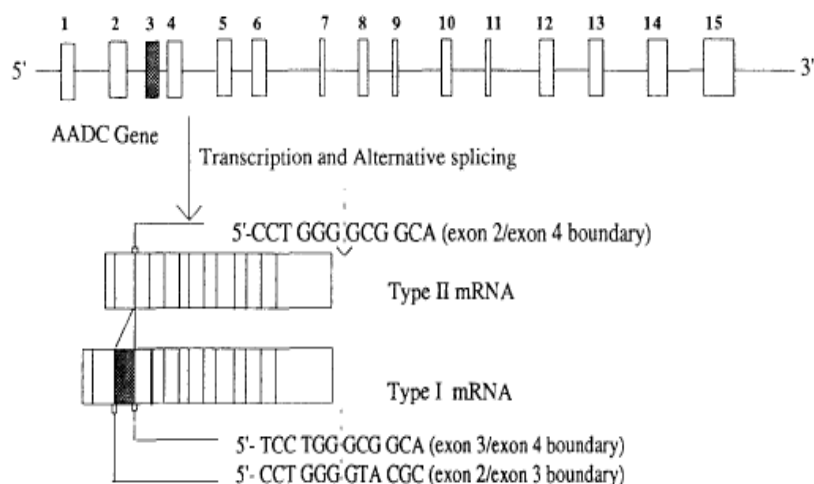
Αρχικά, κυριαρχούσε η πεποίθηση ότι η δημιουργία και των δύο εναλλακτικών μεταγράφων σε ένα είδος ιστού, είναι γεγονότα που αλληλοαποκλείονται λόγω εναλλακτικής συρραφής και χρήση διαφορετικού υποκινητή. Ωστόσο, αυτό το πρότυπο ιστοειδικότητας έχει καταρριφθεί καθώς υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν τη συνύπαρξη των δύο ισομορφών (νευρικής και μη νευρικής φύσης) στο νεφρό και στον πλακούντα όπως και στα περιφερικά ανθρώπινα λευκοκύτταρα [146, 148, 152, 158, 159].

1.3.3.1 Η Ρύθμιση της Έκφρασης του Ανθρώπινου Γονιδίου της DDC σε Μεταγραφικό και Μετα-μεταγραφικό Επίπεδο.

Ένα γεγονός εναλλακτικού ματίσματος έχει περιγραφεί μεταξύ της κωδικής περιοχής του mRNA της DDC. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη δημιουργία δύο μεταγράφων. Το πρώτο μετάγραφο αποτελείται από ολόκληρη την αλληλουχία κωδικής περιοχής του mRNA, ενώ το δεύτερο αποτελεί ένα μικρότερο μετάγραφο από το οποίο απουσιάζει λόγω συρραφής το εξώνιο 3 [160]. Το ολόκληρο μετάγραφο κωδικοποιεί την ισομορφή που συμβολίζεται ως DDC480 και η οποία έχει ενζυμική ενεργότητα ως προς την αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa και της 5-Υδροξυτρυπτοφάνης (5-HTP), ενώ το μικρότερο μετάγραφο κωδικοποιεί την ισομορφή DDC442 που δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα. Ο αριθμός που αναγράφεται δίπλα από κάθε ισομορφή αναφέρεται στον αριθμό των αμινοξέων του ενζύμου.

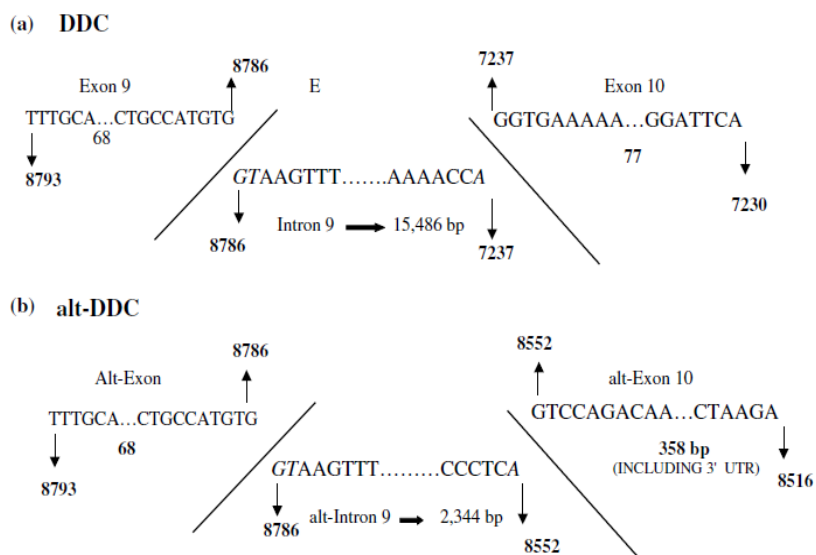
Οι ισομορφές DDC442, DDC480 εκφράζονται ευρύτατα με την DDC442 να αποτελεί την κύρια μορφή σε πολλούς νευρικούς και μη νευρικούς ιστούς χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ρόλος της. Το συγκεκριμένο ένζυμο, θεωρήθηκε ότι δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα, πιθανόν λόγω διαφορετικής εξειδίκευσης της ισομορφής με το υπόστρωμα ή το συμπράγοντα. Το γεγονός αυτό, έχει αμφισβητηθεί από δεδομένα που έχουν δείξει ότι το μετάγραφο νευρικού τύπου από το οποίο απουσιάζει το εξώνιο 3 εκφράζεται στην κυτταρική σειρά μακροφαγικής προέλευσης U937 και έχει ανιχνευτεί η ενεργότητα του ενζύμου που υπολογίζεται στα 4,2 mUnits/mg [151]. Επίσης, το συγκεκριμένο μετάγραφο έχει ανιχνευτεί στα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα και ο ρόλος του προτείνεται ότι αφορά τη ρύθμιση της ανοσοβιολογικής απόκρισης [159].

Η παρουσία του εξωνίου 3 προτείνεται πως έχει μεγάλη σημασία είτε στην αναγνώριση του υποστρώματος είτε στη δόμηση τρισδιάστατης δομής για την πρόσδεση της L-DOPA ή της 5-υδροξυτρυπτοφάνης, καθώς η AADC442 δεν έχει την ικανότητα να καταλύει τη μετατροπή τους σε αντίθεση με την AADC480. Η AADC442 ωστόσο έχει προταθεί ότι μπορεί να καταλύει την αποκαρβοξυλίωση της φαινυλαλανίνης, m-τυροσίνης, p-τυροσίνης με μεγαλύτερη συγγένεια απ' ότι η DDC480. Το εξώνιο 3 έχει βρεθεί ότι είναι το πιο συντηρημένο μεταξύ των ειδών και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι η περιοχή αυτή πιθανόν είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ενζυμική δράση [160]. Εναλλακτικά η AADC442 ίσως ρυθμίζει τη λειτουργία της AADC480 μέσω διμερισμού με το μονομερές άγριου τύπου, είτε καταστέλλοντας είτε ενεργοποιώντας τις κινητικές ιδιότητες. Αυτό όμως δε φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση που η L-DOPA ή η 5-υδροξυτρυπτοφάνη αποτελούν το υπόστρωμα [157].

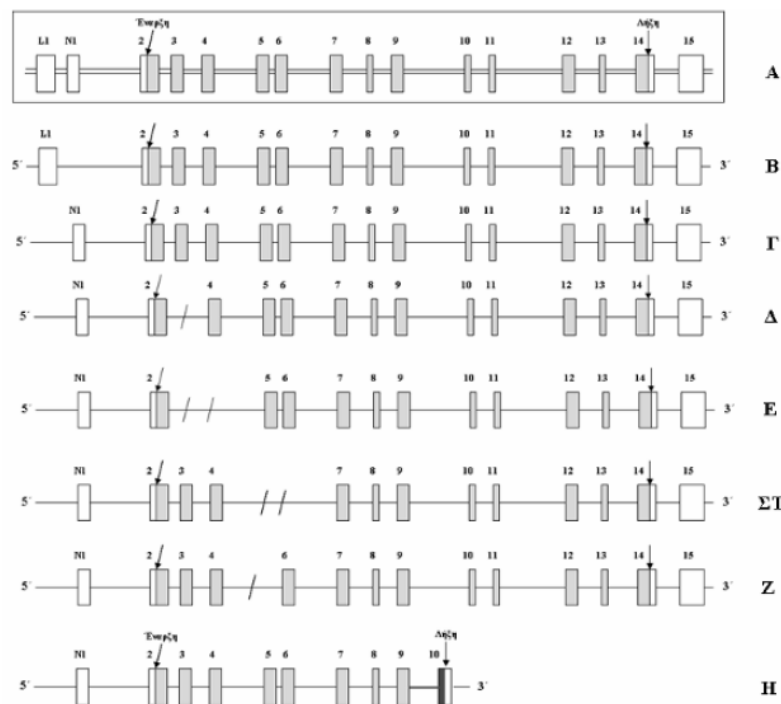


Εικόνα 1.3.3.1: Η δημιουργία εναλλακτικού μεταγράφου απουσία εξωνίου 3 [161]

Το 2004 περιγράφηκε ένα καινούργιο εναλλακτικό κομμένο μετάγραφο του γονιδίου της DDC μεγέθους 1.8 kb που απομονώθηκε από κύτταρα τροφοβλαστών. Ύστερα από κλωνοποίηση, βρέθηκε ότι απουσίαζαν τα εξώνια 10 έως 15 του αρχικού μεταγράφου ενώ παρατηρήθηκε η ύπαρξη ενός επιπλέον εξωνίου 10 μεγέθους 358 bp το οποίο ήταν τοποθετημένο εντός του ιντρονίου 9. Το μετάγραφο περιέχει το νευρικού τύπου εξώνιο 1. Η εναλλακτική αυτή ισομορφή του ενζύμου, που συμβολίστηκε ως Alt-DDC υπολογίζεται ότι αποτελείται από 338 αμινοξέα και μέσω ανάλυσης Western Blot προσδιορίστηκε ότι έχει μοριακή μάζα 37 kDa. Το εναλλακτικό εξώνιο 10 της εναλλακτικής αυτής ισομορφής κωδικοποιεί 23 αμινοξέα του C-τελικού άκρου τα οποία δεν περιλαμβάνονται στην αλληλουχία της ολόκληρης DDC πρωτεΐνης σε αντίθεση με τα υπόλοιπα αμινοξέα που ταυτίζονται. Το συγκεκριμένο μετάγραφο από αναλύσεις με Northern blot προτάθηκε ότι εκφράζεται σε αυξημένο βαθμό σε ανθρώπινο νεφρό και βρέθηκε ότι παρουσιάζει αυξημένη ενεργότητα κάτι που υποδεικνύει ότι πιθανό να έχει κάποια εξειδικευμένη λειτουργία, η οποία αφορά την λειτουργία των νεφρών [158]. Η λειτουργική σημασία του παραπάνω mRNA της DDC ωστόσο μέχρι τώρα παραμένει ελάχιστα κατανοητή [162].



Εικόνα 1.3.3.1.2: Διαφορές στην αλληλουχία του cDNA της a) DDC και της b) Alt- DDC



Εικόνα 1.3.3.1.3: Διαγραμματική απεικόνιση εναλλακτικού ματίσματος στο mRNA του γονιδίου της ανθρώπινης DDC

(Α) Γονίδιο DDC. (Β) Μη-νευρικού τύπου, πλήρους μήκους mRNA. (Γ) Νευρικού τύπου, πλήρους μήκους mRNA. (Δ) Νευρικού τύπου mRNA χωρίς το εξώνιο 3. (Ε) Νευρικού τύπου mRNA χωρίς τα εξώνια 3 και 4. (ΣΤ) Νευρικού τύπου mRNA χωρίς τα εξώνια 5 και 6. (Ζ) Νευρικού τύπου mRNA χωρίς το εξώνιο 5. (Η) Νευρικού τύπου mRNA που κωδικοποιεί την εναλλακτική ισομορφή Alt-DDC.

1.3.3.2 Η Ρύθμιση της DDC σε Μετα- μεταφραστικό επίπεδο

Παλαιότερα, κυριαρχούσε η αντίληψη ότι η DDC δεν συμμετέχει στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης κατεχολαμινών, καθώς εμφανίζεται ακόρεστη και μη ειδική ως προς το υπόστρωμα. Σήμερα, η αντίληψη αυτή τείνει να ανατραπεί καθώς έχουν παρουσιαστεί ενδείξεις ρύθμισης του ενζύμου στα θηλαστικά από παράγοντες που δρουν στους υποδοχείς DA [163].

Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι το φως είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική ενεργότητα. Η έκθεση σε συνθήκες φωτός πειραματόζων (αρουραίων) που είχαν παραμείνει στο σκοτάδι προκάλεσε την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της DDC στον αμφιβληστροειδή χιτώνα τους [164]. Η μεταβολή αυτή έχει προταθεί ότι σχετίζεται με τη συμβολή των D1-υποδοχέων DA και των α2 αδρενεργικών υποδοχέων. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από το αποτέλεσμα της χορήγησης αγωνιστών των υποδοχέων που ανέστειλε την αύξηση της ενεργότητας, ενώ η χορήγηση ανταγωνιστών

των D1-υποδοχέων στο σκοτάδι οδήγησε σε ενεργοποίηση του ενζύμου. Η παρατηρούμενη ενεργοποίηση προτάθηκε ότι οφείλεται σε αύξηση του V_{max} του ενζύμου και αλλαγή της σταθεράς K_m ως προς την L-Dopa και τη φωσφορική πυριδοξάλη [165, 166].

Από μελέτες στον εγκέφαλο αρουραίου [163] και μύος έχουν προκύψει παρόμοια αποτελέσματα. Στον εγκέφαλο, η ενεργοποίηση των υποδοχέων με χορήγηση αγωνιστών αναστέλλει το ένζυμο, ενώ δέσμευση των υποδοχέων με χορήγηση ανταγωνιστών αυξάνει τη δραστηριότητά του. Μια πιθανή εξήγηση του μηχανισμού ρύθμισης είναι η αλλαγή να σχετίζεται με σύνθεση νέων ενζυμικών μορίων όπως στην περίπτωση της χορήγησης κυκλοεξαμιδίου η οποία εμποδίζει την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας [167]. Σε παρόμοια πειράματα ωστόσο έχουν αναφερθεί αντίθετα αποτελέσματα [163] κάτι που αποτελεί ένδειξη της πολυπλοκότητας του μηχανισμού ρύθμισης του ενζύμου.

Ως κύριος μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητας της DDC έχει προταθεί η φωσφορυλίωση του ενζύμου, η οποία οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητάς του. Στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης έχει εντοπιστεί μια σειρά μοτίβων φωσφορυλίωσης που απευθύνονται σε cAMP- εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (PKA) σε πρωτεϊνικές κινάσες C (PKC), σε ασβέστιο-καλμοντουλίνη εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες II (Ca-CM PK II) και σε κατευθυνόμενες από προλίνη πρωτεϊνικές κινάσες (proline-directed protein kinases) [168].

Επίσης, η χορήγηση της forskolin που αυξάνει τα επίπεδα του cAMP και η χορήγηση 8-Bromo-cAMP που ενεργοποιεί την PKA, έχει αποδειχθεί πως αυξάνει την ενεργότητα της DDC σε εγκέφαλο ποντικού [169]. Έχει διατυπωθεί ότι μια cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση αυξάνει παροδικά το V_{max} του ενζύμου έπειτα από τη φωσφορυλίωση του, οδηγώντας σε αύξηση της ενεργότητάς του. Η φωσφορυλίωση της PKA, που προκαλείται από την αύξηση του cAMP και ρυθμίζεται από D2 προσυναπτικούς υποδοχείς DA, οδηγεί σε ενεργοποίηση της με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της DDC και ενεργοποίηση της. Τέλος, ως μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητας της DDC έχει προταθεί η χορήγηση φορβολικών εστέρων, που ενεργοποιούν την PKC αλλάζοντας την K_m και αυξάνοντας το V_{max} του ενζύμου [170].

1.3.4 Η Τοπολογία της DDC.

Η κατανομή της DDC είναι ευρεία στα θηλαστικά έντομα και φυτά όπου το ένζυμο βρίσκεται σε ιστούς νευρικής και μη νευρικής προέλευσης. Η παρουσία του στα νευρικά κύτταρα δικαιολογείται από την ιδιότητα του να συμμετέχει στην νευροδιαβιβαστική σύνθεση ενώ ο ρόλος του σε ιστούς μη

νευρικής προέλευσης συνδέεται με ενεργότητα μη ειδική αποκαρβοξυλάσης αλλά δεν είναι ακόμα γνωστός [171].

1.3.4.1 Η Παρουσία της DDC στο ΚΝΣ.

Η υψηλή ενεργότητα του ενζύμου DDC, όσον αφορά το ΚΝΣ έχει εντοπιστεί στους ντοπαμινεργικούς και σεροτονικούς νευρώνες. Το γεγονός αυτό, επιβεβαιώθηκε με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης [172], μέτρηση ενεργότητας [173] και ανοσοϊστοχημείας [174, 175]. Η υψηλή ενεργότητα στους νευρώνες της μελανοραβδωτής οδού είναι αναγκαία για την παραγωγή DA, δεδομένου ότι μόνο η L-DOPA μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και όχι η DA [176]. Επίσης υψηλή ενεργότητα του ενζύμου έχει εντοπιστεί στην επίφυση, τον υποθάλαμο, το ραβδωτό και τον αμφιβληστροειδή, ενώ υψηλά επίπεδα mRNA της DDC έχουν βρεθεί στη μέλαινα και υπομέλαινα ουσία και τον οσφρητικό λοβό [177]. Η παρουσία του ενζύμου στον υποθάλαμο και την επίφυση υποδεικνύει σύνδεση με τη νευροενδοεκκριτική του δράση. Συγκεκριμένα, τα διάφορα συστήματα νευροδιαβιβαστών του υποθαλάμου και του μεσεγκεφάλου μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη σύνθεση και την έκκριση των υποθαλαμικών νευροεκκριτικών ορμονών. Είναι πιθανόν η ντοπαμίνη να έχει την ικανότητα να τροποποιεί την έκκριση των γοναδοτροπινών, της προλακτίνης και της αυξητικής ορμόνης [178-180]. Η ύπαρξη και δράση της DDC, του τελευταίου ενζύμου στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης των κατεχολαμινών, σε αυτά τα συστήματα φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αντίστοιχων φυσιολογικών διεργασιών. Η παρουσία και δράση της DDC στους νευρώνες της μελανοραβδωτής οδού είναι αναγκαία για την παραγωγή ντοπαμίνης, δεδομένου ότι μόνο η L-Dopa μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και όχι η ντοπαμίνη.

Συν τοις άλλοις, η παρουσία της DDC έχει προσδιοριστεί σε κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν την υδροξυλάση της τρυπτοφάνης και υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) και ονομάζονται D κύτταρα ("D cells"), αλλά και σε μια σειρά από νευρώνες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, οι οποίοι δεν παράγουν και δεν αποθηκεύουν DA και σεροτονίνη. Σε αυτούς τους νευρώνες το ένζυμο είναι πιθανόν να οδηγεί στην παραγωγή τυραμίνης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την τυροσίνη [176].

1.3.4.2 Η Κατανομή της DDC στη Γλοία.

Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου της DDC όσο και το ίδιο το ένζυμο έχουν προσδιοριστεί σε κύτταρα γλοίας [176]. Τα κύτταρα γλοίας, τα οποία αποτελούν βοηθητικά κύτταρα του νευρικού ιστού,

έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν τόσο το ένζυμο και το mRNA του [181, 182]. Φυσιολογικά, στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου, η DDC που ανιχνεύεται στη γλοία δε θεωρείται πιθανό να συμμετέχει στην παραγωγή κατεχολαμινών [176], αλλά στο σχηματισμό ορισμένων αμινών (trace amines), όπως την τυραμίνη, τη φαινυλαιθυλαμίνη και την τρυπταμίνη. Οι αμίνες αυτές, θα μπορούσαν ενδεχομένως με τη σειρά τους να ρυθμίζουν τη μονοαμινεργική νευροδιαβίβαση [183-185]. Η γλοία θα μπορούσε να αποτελεί μία επιπλέον περιοχή αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και, κατά συνέπεια, ιδιαίτερα σημαντική σε παρκινσονικούς ασθενείς, όπου παρατηρείται απώλεια απολήξεων του ραβδωτού σώματος του εγκεφάλου. Η εξωγενής L-Dopa, που χορηγείται σε αυτές τις περιπτώσεις, θα μπορούσε να αποκαρβοξυλιώνεται από τη DDC που εντοπίζεται στη γλοία, βελτιώνοντας τα συμπτώματα των ασθενών.

1.3.4.3 Η Κατανομή της DDC σε Περιφερικούς Ιστούς.

Η DDC έχει επίσης εντοπιστεί σε περιφερειακά όργανα όπως το ήπαρ, τα νεφρά, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, τους πνεύμονες, τους σιελογόνους αδένες, το σπλήνα, το στομάχι και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων καθώς και σε όλο τον πεπτικό σωλήνα [109, 111, 186, 187]. Έχει προσδιοριστεί ότι η υψηλότερη ενεργότητα της DDC εμφανίζεται στο νεφρό και το ήπαρ [137]. Η υψηλή έκφραση της DDC στο νεφρό είναι δύσκολο να δικαιολογηθεί. Η DDC των θηλαστικών έχει απομονωθεί από διάφορες πηγές όπως ο χοίρος, αρουραίος και άνθρωπος. Το καλύτερα μελετημένο ένζυμο ωστόσο είναι αυτό που έχει απομονωθεί από νεφρό χοίρου. Όπως έχει προταθεί, είναι πιθανό η υψηλή έκφραση του ενζύμου στο νεφρό να σχετίζεται με τον έλεγχο της ισορροπίας νερού και ηλεκτρολυτών από την παραγόμενη DA [188]. Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι το ενεργό ένζυμο εκφράζεται στα ανθρώπινα περιφερειακά λευκοκύτταρα [159]. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχει επιτευχθεί η ανίχνευση της παρουσίας του ενζύμου σε ορό ανθρώπου, πιθήκου, αρουραίου και ποντικού [137]. Στον άνθρωπο ωστόσο, τα επίπεδα ενεργότητας της DDC είναι αρκετά χαμηλότερα και παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου σε ασθενείς με συγκεκριμένες νεοπλασίες όπως νευροβλάστωμα ή χρωμοφαιοκύτωμα [114, 137, 189].

Πολλά από τα κύτταρα των περιφερικών ιστών που περιέχουν DDC ανήκουν στο σύστημα Πρόληψης και Αποκαρβοξυλίωσης Πρόδρομων Αμινών (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation system, APUD) [190, 191]. Τα κύτταρα αυτά προσλαμβάνουν πρόδρομα βιογενών αμινών όπως η L-DOPA και η 5-HTP και με τη βοήθεια της DDC τα αποκαρβοξυλιώνουν και μέσω ενός μεταφορέα μονοαμινών αποθηκεύουν τις πεπτιδικές ορμόνες σε εκκριτικά κυστίδια [192].

Η υψηλότερη ενεργότητα και παρουσία του ενζύμου, σε σχέση με τους υπόλοιπους περιφερικούς ιστούς, εντοπίζεται στο ήπαρ και στον νεφρό, όπου δεν βιοσυντίθενται μονοαμίνες. Αν και η φυσιολογική σημασία του ενζύμου σε αυτούς τους ιστούς δεν είναι γνωστή, είναι πιθανόν να παίζει βασικό ρόλο στο μεταβολισμό άλλων αρωματικών αμινοξέων [137]. Στους νεφρούς η DDC εντοπίζεται στο εγγύς και ευθύ εσπειραμένο σωληνάριο και ελέγχει την έκκριση ντοπαμίνης από το νεφρό [193]. Η έκφραση και ενεργότητα της DDC, πιθανόν να συνδέεται τόσο με την ρύθμιση της έκκρισης του νατρίου [194] όσο και ιόντων φωσφόρου [195] στα νεφρικά σωληνάρια. Η παραγόμενη ντοπαμίνη ελέγχει τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών και την ισορροπία του νερού αναστέλλοντας τη δράση της ΑΤΡάσης Na^+/K^+ των νεφρικών σωληναρίων με αντιστρεπτό και δοσο- εξαρτώμενο τρόπο [196], αλλά και μέσω του ιοντοανταλλάκτη Na^+/H^+ [197]. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η ανασταλτική δράση της ντοπαμίνης πραγματοποιείται μέσω δύο μηχανισμών, μέσω πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και μέσω cAMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (PKA). Ο πρώτος μηχανισμός δρα χρονικά νωρίτερα από το δεύτερο μηχανισμό [198]. Ενζυμική ενεργότητα αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa έχει εντοπιστεί στην εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος. Η παραγόμενη ντοπαμίνη θεωρείται ότι προστατεύει το βλεννογόνο του επιθηλίου του εντέρου [199]. Η DDC εντοπίζεται στο πλάσμα ανθρώπινου αίματος [200]. Αναφορές για παρουσία ενεργότητας έχουν γίνει στον ορό αίματος ινδικού χοιριδίου, πιθήκου, αρουραίου και ποντικού [201]. Στον άνθρωπο, τα επίπεδα ενεργότητας της DDC, που είναι όμως αρκετά χαμηλότερα, αυξάνονται σε ασθενείς με νεοπλασίες όπως νευροβλάστωμα ή φαιοχρωμοκύττωμα [189]. Η μέτρηση των επιπέδων αυτών έχει χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση και παρακολούθηση των ασθενειών αυτών [200]. Η παρουσία του ενζύμου σε ορό αποτελεί έμμεση ένδειξη έκκρισης της ενζυμικής πρωτεΐνης στα εξωκυττάρια υγρά, γεγονός που έχει τεκμηριωθεί για την περίπτωση της β-υδροξυλάσης της ντοπαμίνης (DBH) [202], η οποία αποτελεί το επόμενο ένζυμο της βιοσυνθετικής οδού των κατεχολαμινών.

1.3.4.4 Η Υποκυτταρική Τοπολογία της DDC.

Όσον αφορά την υποκυτταρική της τοπολογία του ενζύμου, αρχικά η DDC θεωρήθηκε πως ήταν ένα αποκλειστικά κυτταροπλασματικό ένζυμο [111, 203]. Ωστόσο, μελέτες του εργαστηρίου μας σε κυτταρικές σειρές τόσο του ΚΝΣ όσο και της περιφέρειας υπέδειξαν ότι το ένζυμο σχετίζεται με το διαλυτό αλλά και το μεμβρανικό κλάσμα [152]. Επιπρόσθετα, με τη χρήση της L-DOPA ως υπόστρωμα, έχει αναφερθεί ότι το 35% του ενζύμου συνδέεται με τη συναπτοσωματική δεξαμενή [204]. Τα

παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και σε περιφερικά λευκοκύτταρα και στις μακροφαγικής προέλευσης κυτταρικές σειρές U937 [151].

Πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας, σε εγκέφαλο θηλαστικών και στο έντομο *Ceratitis capitata* αποκάλυψαν την παρουσία του ενζύμου στο υδρόφοβο και ισχυρά υδρόφοβο κλάσμα [205, 206]. Η DDC που ανιχνεύεται στο μεμβρανικό κλάσμα εμφανίζεται ενζυμικά ενεργή ως προς την αποκαρβοξυλίωση της L-DOPA σε DA. Επώση των μεμβρανικών κλασμάτων παρουσίας της γενικής φωσφολιπάσης C (PLC) δεν τροποποίησε το ρυθμό εξαγωγής του μορίου, υποδεικνύοντας την ενσωμάτωση του μορίου στη μεμβρανική διπλοστιβάδα. Κατεργασία των μεμβρανών με ειδική για τη φωσφατιδυλ- ινοσιτόλη φωσφολιπάση C (PI- PLC) δεν έχει καμία επίδραση στην κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας της DDC στο υδρόφοβο και ισχυρά υδρόφοβο κυτταρικό κλάσμα, αποκλείοντας την πιθανότητα ύπαρξης φωσφατιδυλ- ινοσιτολικής λιπιδικής άγκυρας για την πρόσδεση της DDC με τη μεμβρανική διπλοστιβάδα. Το ένζυμο που απελευθερώνεται με σχετική ευκολία στο διαλυτό κλάσμα του εντόμου *Ceratitis capitata* απελευθερώνεται με σχετική ευκολία στο διαλυτό κλάσμα, υποδεικνύοντας χαλαρότητα στη φύση σύνδεσης της DDC με τις μεμβράνες. Αντίθετα, σε εγκέφαλο θηλαστικών, φαίνεται να υπάρχει σχετικά ισχυρότερη σύνδεση των μορίων της DDC με τις μεμβράνες. Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν την πολύπλοκη κυτταρική τοπολογία του μορίου.

Πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας, που αφορούν τη διερεύνηση της υποκυτταρικής κατανομής της DDC σε κυτταρικές σειρές του ΚΝΣ και της περιφέρειας αναφέρουν ότι η DDC εντοπίζεται τόσο στο διαλυτό όσο και στο μεμβρανικό κλάσμα [152]. Πειράματα απελευθέρωσης της DDC από το μεμβρανικό κλάσμα της κυτταρικής σειράς HEK- 293 (ανθρώπινα εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα) *in vitro* υποδηλώνουν ένα ρυθμιζόμενο μηχανισμό για τη διαλυτοποίηση του ενζύμου. Η διαλυτοποίηση του ενζύμου επηρεάζεται από το pH, το χρόνο επώσης, δισθενή κατιόντα και αναστολείς πρωτεασών. Σύμφωνα με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, είναι πιθανό το κύτταρο να ρυθμίζει την ενεργότητα του ενζύμου μεταβάλλοντας την υποκυτταρική του τοπολογία.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και άλλα ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης κατεχολαμινών όπως η β-υδροξυλάση της DA (DBH), η υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) καθώς και η φαινυλαιθανολαμίνη N-μεθυλοτρανσφεράση (PNMT) εντοπίζονται τόσο στο μεμβρανικό όσο και στο διαλυτό κλάσμα [207-209].

1.3.5 Η Σχέση της DDC με τη PD.

Η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία *pars compacta*, που οδηγεί σε μείωση της DA στο ραβδωτό σώμα, είναι ο κεντρικός μηχανισμός που διέπει τα κινητικά χαρακτηριστικά της νόσου του PD. Η υποκατάσταση της απώλειας της DA μέσω της συστηματικής χορήγησης του προδρόμου της DA την L-DOPA αντιπροσωπεύει μια επαναστατική ανακάλυψη στην αντιμετώπιση της νόσου του PD που ξεκίνησε πριν από 50 χρόνια. Αποτελεί την κυριότερη θεραπεία που χρησιμοποιείται σήμερα και αποσκοπεί στην αύξηση της παραγωγής DA εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος ύστερα από αποκαρβοξυλίωση της L-DOPA από την DDC. Ο λόγος χρήσης της L-DOPA και όχι της DA ως φάρμακο οφείλεται στην ικανότητα της να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε αντίθεση με την DA [126]. Έτσι κατά τη διάρκεια της θεραπείας σημειώνεται αύξηση των επιπέδων της L-DOPA στον εγκέφαλο, με συνέπεια την αυξημένη παραγωγή DA. Η L-DOPA χορηγείται με την ταυτόχρονη παρουσία κάποιου περιφερικού αναστολέα όπως η βενσεραζίδη, η *carbidopa*, οι οποίοι αποτρέπουν την αποκαρβοξυλίωση της L-DOPA σε DA στους περιφερειακούς ιστούς και μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης των παρενεργειών που θα προέκυπταν από την συνέπεια αυτή. Οι αναστολείς αυτοί δεν μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [210].

Η αύξηση των επιπέδων της L-DOPA, σε συνδυασμό με τα δευτερογενώς μειωμένα επίπεδα του ενζύμου DDC, λόγω του εκφυλισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων, είναι εξαιρετικά πιθανό να καθιστούν την L-Dopa αποκαρβοξυλάση ένζυμο-κλειδί (*rate-limiting enzyme*) στη PD. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα από την εξέλιξη της θεραπείας η αποτελεσματικότητα της μειώνεται σταδιακά. Αυτό ίσως οφείλεται σε μηχανισμούς αυτορρύθμισης και συγκεκριμένα ανάδρομης ανασχεσης που δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα ως απόκριση στην αυξημένη σύνθεση DA. Η αύξηση της DA που έχει προκληθεί λόγω εξωγενούς χορήγησης της L-DOPA είναι πιθανόν να μειώνει την ενεργότητα της DDC και κατά συνέπεια τη σύνθεση DA από τη χορηγούμενη L-DOPA [210]. Ωστόσο, η DDC που εντοπίζεται στη γλοία θα μπορούσε να κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στη θεραπεία της νόσου, καθώς είναι πιθανόν να αποκαρβοξυλιώνει την εξωγενώς χορηγούμενη L-DOPA στους ασθενείς βελτιώνοντας τα συμπτώματά τους.

Επίσης, η χρόνια χορήγηση L-DOPA οδηγεί στην εμφάνιση ενός φαινομένου με διαφορετικές και απότομες αντιδράσεις στην χορήγηση της L-DOPA. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται on-off και αντιμετωπίζεται μέσω σύντομης παύσης της χορήγησης L-DOPA προκειμένου να ρυθμιστεί η ομοιόσταση της αποκαρβοξυλάσης της L-DOPA [140]. Έχουν προταθεί και δοκιμαστεί διάφορες πρακτικές για την αντιμετώπιση των φαινομένων που προκύπτουν λόγω αρνητικής ανάδρασης της DA

στη DDC. Η ουσία L-διπρενύλιο έχει βοηθητικό αποτέλεσμα και χορηγείται μαζί με την L-DOPA, καθώς προκαλεί αύξηση στα επίπεδα της έκφρασης των mRNA της DDC και επιβραδύνει τα προβλήματα που προκύπτουν λόγω της αρνητικής ανάδρασης [210]. Ένα ακόμα μειονέκτημα που προκύπτει από τη χρόνια θεραπευτική χορήγηση L-DOPA στους ασθενείς είναι τα αυξημένα επίπεδα DA που εντοπίζονται στον οργανισμό και μπορεί να προκαλέσουν δυσκινησία και παραισθήσεις. Τα συμπτώματα αυτά σε μελέτες που έχουν γίνει με χορήγηση του ενζύμου της DDC και επιμόλυνση με το γονίδιο VMAT-2 σε παρκινσονικά μοντέλα μυών, έχουν μειωθεί σε μεγάλο ποσοστό λόγω της αυξημένης μετατροπής της L-DOPA σε DA αλλά και αύξηση της εναπόθεσης της DA σε συναπτικά κυστίδια [211, 212]. Επιπλέον, όπως έχει διαπιστωθεί παρουσιάζεται μια μεταβλητότητα όσον αφορά τη γαστρεντερική απορρόφηση της L-DOPA και τη μεταφορά μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Νέες συνθέσεις παρατεταμένης απελευθέρωσης της L-DOPA καθώς και η συνεχής απελευθέρωση (είτε εντερικά μέσω ενδοσκοπικών γαστροπνευμονιολογικών διαδερμικών σωλήνων είτε υποδόρια μέσω μικρών αντλιών) έχουν αναπτυχθεί ή αναπτύσσονται. Πράγματι, κλινικές παρατηρήσεις σε ασθενείς που χορηγήθηκε το φάρμακο με ενδοφθάλμια έγχυση, υποστηρίζουν την αξία της συνεχόμενης διέγερσης αφού οδήγησαν σε πρόληψη των προβλημάτων δυσκινησίας [213].

Είναι πλέον αποδεκτό ότι τα συμπτώματα που εμφανίζονται στους ασθενείς με PD μπορεί να οφείλονται στη διαδικασία μετατροπής των τοξικών πρωτοϊνιδίων σε ώριμα ινίδια ASYN με αποτέλεσμα την τοξική δυσλειτουργία της ASYN. Ως κύρια θεραπευτική αγωγή, χρησιμοποιείται η χορήγηση της L-DOPA, γεγονός που από τη μία πλευρά αυξάνει τα επίπεδα συναπτοσωμικής DA που είναι μειωμένα λόγω της προόδου του νευροεκφυλισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων, αλλά όμως οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων και της κυτταροπλασματικής DA που βοηθάει τη συσσώρευση των ολιγομερών και πρωτοϊνιδίων ASYN και επιβαρύνει την εξέλιξη της νόσου [214]. Η DA είναι δυνατό να συνδέεται ομοιοπολικά με την ASYN δημιουργώντας ένα παράγωγο μέσα στο κύτταρο το οποίο σταθεροποιεί τα πρωτοϊνίδια και αναστέλλει τη μετατροπή τους σε ώριμα ινίδια.

Γονιδιακή θεραπεία της PD

Προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας, οι οποίες βασίζονται σε γενετικά σχεδιασμένους ιικούς φορείς που μπορούν να εισάγουν γονίδια στα κύτταρα ζωντανών οργανισμών, μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως η PD. Μεταξύ των διαφόρων ιικών φορέων που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή θεραπεία συγκαταλέγεται και ο ανασυνδυασμένος αδενο-σχετιζόμενος ιικός φορέας (recombinant adeno-associated virus, rAAV). Μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματική διαμόλυνση νευρώνων χρησιμοποιώντας rAAV φορέα, χωρίς

σημαντικές παρενέργειες, καθώς είναι μη μολυσματικός, μη καρκινογόνος και δεν προκαλεί ανοσολογική αντίδραση [215].

Δύο στρατηγικές ακολουθούνται για τη γονιδιακή θεραπεία της PD. Αναφορικά, η πρώτη στρατηγική αποτελεί την αποκατάσταση της σύνθεσης παραγωγής DA, με την εισαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της DA. Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στη βελτίωση των κινητικών συμπτωμάτων της PD, τα οποία προκαλούνται από την απώλεια DA λόγω προοδευτικού θανάτου των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου. Η δεύτερη στρατηγική είναι ο περιορισμός της νευροεκφυλιστικής διαδικασίας μέσω διαμόλυνσης με ανασυνδυασμένους ιούς που περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν για αυξητικούς παράγοντες, αντι-οξειδωτικά και αντι-αποπτωτικά μόρια. Πειράματα ένεσης ιϊκών φορέων με το γονίδιο της DDC στο ραβδωτό σώμα παρκινσονικού μοντέλου αρουραίου, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων DA στο ραβδωτό σώμα καθώς και την αύξηση της ενεργότητας της DDC [216]. Οι κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους βρίσκονται σε πρωταρχικά στάδια αλλά έχουν οδηγήσει σε βελτίωση των κινητικών συμπτωμάτων των ασθενών, χωρίς να αναφέρονται αξιοσημείωτες παρενέργειες εξαιτίας της γονιδιακής θεραπείας [215].

1.3.6 Σχέση της DDC με τη AD.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι “tauopathies” είναι νευροεκφυλιστικές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από την τοξική συσσώρευση μη φυσιολογικών μορφωμάτων της πρωτεΐνης tau, η οποία σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους. Η νόσος του AD και ο εκφυλισμός του μετωπιαίου λοβού είναι οι συνηθέστερες ασθένειες της κατηγορίας αυτής. Διάφορες κλινικές στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί για τη μείωση της τοξικότητας της tau, όπως η μείωση της φωσφορυλίωσής της, της διάσπασής της, της ινώδωσής της, καθώς και η έκφρασή της. Παρ’ όλα αυτά, δεν υπάρχουν προς το παρόν επεξεργασίες που σταματούν ή αντιστρέφουν τη συσσώρευση της παθολογικής tau σε ασθενείς [217].

Πολλές μελέτες έχουν δείξει, πως η υπερέκφραση της tau, αλλάζει την ντοπαμινεργική σηματοδότηση, μέσω απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων [218, 219]. Επιπλέον, η απώλεια των *dop-2* και *dop-3*, δύο υποδοχείς DA τύπου D2 στον *C. elegans*, έδειξε σημαντική μείωση τοξικότητας που επάγεται απ’ την tau [220]. Στη συνέχεια, ενεργοποίηση των D1 υποδοχέων DA, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της φωσφορυλίωσης της tau [221]. Οι Kow και συνεργάτες, προσπάθησαν συν τοις άλλοις να αποδείξουν τον κατασταλτικό ρόλο της DDC στην τοξικότητα της tau σε διαγονιδιακά σκουλήκια. Η απώλεια του γονιδίου της DDC του *C. elegans*, *bas- 1*, είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη

συσσώρευση φωσφορυλιωμένης και ισχυρά υδρόφοβης tau πρωτεΐνης, καθώς επίσης και τη μείωση της νευρωνικής απώλειας. Η απώλεια της λειτουργίας σε άλλα γονίδια στις οδούς σύνθεσης της DA και σεροτονίνης, δεν αλλοίωσε την τοξικότητα της tau, παρ' όλα αυτά η λειτουργία τους απαιτείται για την καταστολή της τοξικότητας από τη DDC [217].

1.4 Βιολογική Σημασία Ντοπαμίνης (Dopamine- DA) και Ντοπαμινεργικού Συστήματος στον Εγκέφαλο.

Η DA είναι ένας νευροδιαβιβαστής ευρέως διανεμημένος στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) και σε ορισμένες περιφερικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του καρδιαγγειακού και του νεφρικού συστήματος. Στον εγκέφαλο, ο DA εμπλέκεται στον έλεγχο των κινήσεων, της γνώσης, των συναισθημάτων, της μνήμης, του μηχανισμού ανταμοιβής και της ρύθμισης της έκκρισης προλακτίνης από την υπόφυση. Πολλές ασθένειες έχουν σχέση με διαταραχές της μετάδοσης DA όπως νευροψυχιατρικές διαταραχές, όπως διαταραχή υπερκινητικότητας έλλειψης προσοχής (ADHD), σύνδρομο Tourette (TS), σχιζοφρένεια, ψύχωση, κατάθλιψη κλπ. Και με νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η PD, η HD, πολλαπλή σκλήρυνση (MS) [222].

Ιστορικά, η σημασία του ντοπαμινεργικού συστήματος στον εγκέφαλο επισημάνθηκε εξαιτίας της διερεύνησης της PD, η οποία είναι αποτέλεσμα του εκφυλισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (SNc). Υπάρχουν τρεις κύριες πηγές DA στο ΚΝΣ: το μονοπάτι του νωτιαίου μυελού, το μεσοκορτικολυμπιδικό μονοπάτι και η φυματοχοανική οδός, που εμπλέκονται σε διαφορετικά νευροφυσιολογικά χαρακτηριστικά [222].

Οι νευρώνες που περιέχουν DA βρίσκονται κυρίως στην περιοχή του μεσεγκεφάλου, οι οποίοι μπορούν να εντοπιστούν σε περιοχές της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας και στην κοιλιακή καλυπτρική περιοχή και οι οποίες προβάλλουν σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, ασκώντας διαφορετικές λειτουργίες [223]. Πιστεύεται, πως η αλληλεπίδραση μεταξύ των υψηλών επιπέδων της DA με ένα προ- οξειδωτικό τοπικό περιβάλλον της μέλαινας ουσίας, προωθεί την αύξηση του οξειδωτικού στρες και κατ' επέκταση τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων [224].

Επιπλέον, ο Li και συνεργάτες μελέτησαν τις επιπτώσεις που έχουν οι DA και η L- DOPA στις PD και AD, δείχνοντας την ικανότητα των κατεχολαμινών να αποικοδομούν αμυλοειδικά ινίδια. Δείξανε, μερικές δραστικές μορφές των κατεχολαμινών (DA, L- DOPA και επινεφρίνη) να είναι προϊόντα οξείδωσης και πως σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις ανέστειλαν τον *in vitro* σχηματισμό αμυλοειδικών ινιδίων Αβ και ASYN και προκάλεσαν την αποικοδόμησή τους. Συνοψίζοντας, οι αναστολείς της

συσσωμάτωσης αυτών των πολυπεπτιδίων, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών θεραπείας ή ελέγχου των νόσων αυτών [225].

1.4.1 DA και Οξειδωτικό στρες.

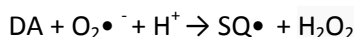
Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ντοπαμινεργικών κυττάρων αποτελούν μεγάλης σημασίας όσον αφορά τη διερεύνηση της αιτιολογίας του επιλεκτικού εκφυλισμού τους στις νευροεκφυλιστικές νόσους. Πολλές έρευνες εστιάζονται στο χαρακτηρισμό των παραγόντων του περιβάλλοντος αυτών των κυττάρων που τα καθιστούν περισσότερο ευαίσθητα στη δημιουργία συσσωματωμάτων και ακολούθως στον εκφυλισμό. Μια σημαντική ιδιαιτερότητα των ντοπαμινεργικών κυττάρων, είναι το ιδιαίτερα οξειδωτικό περιβάλλον τους. Το τελευταίο χαρακτηριστικό θεωρείται πως αποτελεί αιτιολογία για την ανάπτυξη των νευροεκφυλιστικών νόσων.

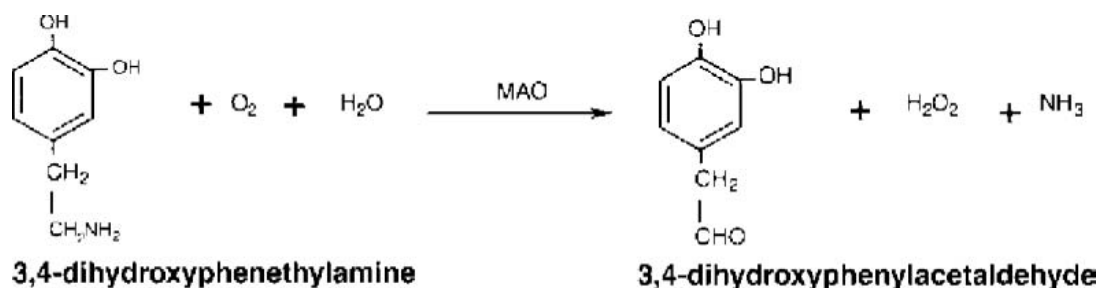
Η DA μετά τη σύνθεσή της, συσσωρεύεται στα συναπτικά κυστίδια μέσω του κυστιδιακού μεταφορέα των μονοαμινών (Vesicular monoamine transporter- VMAT). Σε παθολογικές καταστάσεις και κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής γήρανσης, η αυξημένη απελευθέρωση DA από τα κυστίδια προάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών ROS (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$), καθώς και τοξικών ειδών κινονών. Αυτά συσσωρεύονται και συμβάλλουν στον νευροεκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος [226]. Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, η DA δεν επιφέρει νευροτοξικά αποτελέσματα, παρ' όλα αυτά αλλαγές στην έκκριση της DA ή/και του μεταβολισμού της, θα μπορούσαν δυνητικά να οδηγήσουν σε νευροτοξικότητα. Οι σχετικοί μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς. Σχετικές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι η νευροτοξικότητα μπορεί να προκληθεί και από οξειδωτικό στρες, νευρο- φλεγμονή και αποπτωτικές διαδικασίες [222]. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα του φλοιού, του ραβδωτού σώματος και του μεσεγκεφάλου, είναι επιρρεπή σε θεραπεία με DA, εμφανίζοντας τοξικά φαινόμενα [227-229]. Έχει δειχθεί πως, η DA μπορεί να δράσει μέσω οξειδωτικών και μη οξειδωτικών μηχανισμών, με ενζυμική και μη ενζυμική οξείδωση της DA μέσω οξειδοαναγωγικών ενώσεων όπως δραστικές ρίζες οξυγόνου και DA- κινόνες/ ημικινόνες. Επίσης, αντιδράσεις συμπύκνωσης της DA με καρβονυλομάδες αλδεϋδών και ακετοξέων μετατρέπονται σε τοξικά κατιόντα με N- μεθυλίωση [224].

Η κύρια ενζυμική οξειδωτική μεταβολική οδός της DA στον εγκέφαλο είναι μέσω της μονοαμινοοξειδάσης (MAO), που βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η MAO καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση της DA σε ντοπαλδεϋδη (DOPAL) με ταυτόχρονη παραγωγή H_2O_2 (εικόνα 3.7.1). Από τις δύο μορφές της MAO, κατά προτίμηση αλλά όχι απαραίτητα, η MAO A, μεταβολίζει τη σεροτονίνη και τη νοραδρεναλίνη και η οποία εντοπίζεται κυρίως σε κατεχολαμινεργικά κύτταρα του

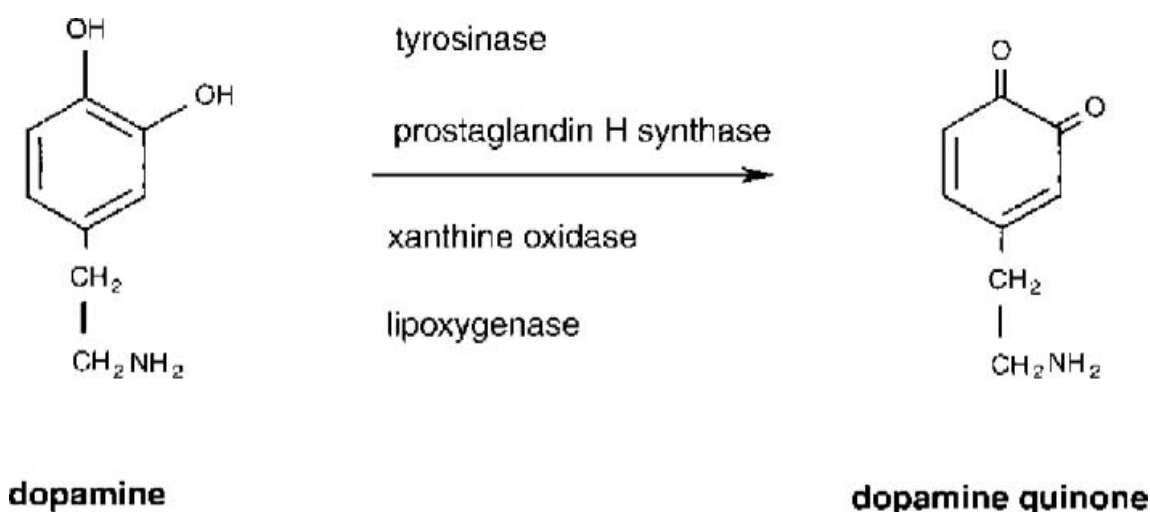
στελέχους του εγκεφάλου, αλλά και στη μέλαινα ουσία [230]. Αντιθέτως, η DA μεταβολίζεται από την MAO B, η οποία εντοπίζεται σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές του υποθαλάμου, καθώς και σε αστροκύτταρα [230, 231]. Επίσης και άλλα ένζυμα που βρίσκονται στον εγκέφαλο είναι ικανά να οξειδώσουν της DA, στα οποία συμπεριλαμβάνονται η λιποξυγενάση [232], η οξυγονάση ξανθίνης [233] και τα οποία καταλύουν την οξείδωση της DA παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπως και η τυροσινάση και η συνθάση της προσταγλαδίνης H [224]. Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ενζυμικών αντιδράσεων, η DA οξειδώνεται σε DA- κινόνη (DAQ) υψηλής δραστηριότητας (εικόνα 1.4.1.2). Όμως, δεν είναι ακόμη σαφές σε ποιο βαθμό αυτά τα ένζυμα συμβάλλουν στην οξείδωση της DA στον ανθρώπινο εγκέφαλο, αν και για την προσταγλαδίνη αποδείχθηκε ότι η ενεργότητά της ήταν σαφώς μεγαλύτερη στη μέλαινα ουσία παρκινσονικών εγκεφάλων, σε σύγκριση με αντίστοιχους αλτσχάϊμερικούς εγκεφάλους και εγκεφάλους ελέγχου [234].

Η νευροτοξική δράση της οξείδωσης της DA, οφείλεται στη δημιουργία των προϊόντων της διαδικασίας αυτής. Τα πιο σχετικά και τα πιο μελετημένα προϊόντα οξείδωσης DA είναι η DAQ, η 6-υδροξυδωπαμίνη (6-OHDA), η νευρομελανίνη (NM) και η 5-S-κυστεΐνυλ DA, τα οποία συμμετέχουν στα μη ενζυμικά οξειδωτικά μεταβολικά μονοπάτια της DA. Η χαρακτηριστική ομάδα της κατεχόλης της DA, είναι μια φαινολική ένωση και έτσι μπορεί να υποβληθεί σε οξείδωση από το οξυγόνο σε φυσιολογικό pH [235]. Αυτή η αυτο- οξείδωση της DA παράγει DAQ (εικόνα 1.4.1.2), ανάλογα με την οξειδωτική αντίδραση της τυροσινάσης ή της συνθάσης της προσταγλαδίνης H. Η σύνθετη αντίδραση οξείδωσης, που προκαλείται από το οξυγόνο, έχει επίσης ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της δραστικής ρίζας της ημικινόνης (SQ•) και τη μείωση του μονοσθενούς οξυγόνου με επακόλουθη παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και της ρίζας του υδροξυλίου [235, 236].



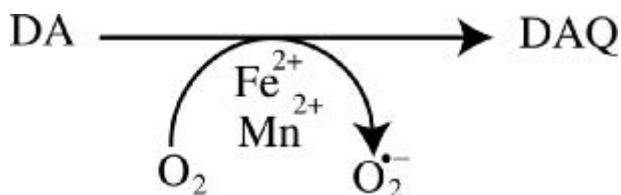


Εικόνα 1.4.1.1 Οξειδωτική απαμίνωση της 3,4- διϋδροξυφαιναιθυλαμίνης (DA) σε 3,4- διϋδροξυφαινυλακεταλδεϋδη οδηγώντας στη δημιουργία H₂O₂.

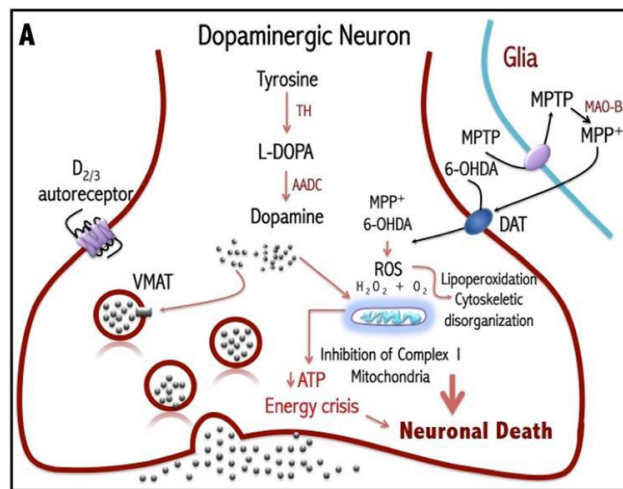


Εικόνα 1.4.1.2 Ενζυμική οξείδωση της DA σε DA- κινόνη

Εν τούτοις, η μη- καταλύόμενη αυτο- οξείδωση της DA είναι σχετικά αργή σε φυσιολογικό pH, αλλά επιτυγχάνεται από στοιχεία μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος και το μαγγάνιο. Και τα δύο μέταλλα καταλύουν την οξείδωση της DA σε DAQ με ταυτόχρονη παραγωγή ROS.



Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία σε σοβαρές περιπτώσεις της PD, όπου η περιεκτικότητα σε σίδηρο είναι υψηλή [237, 238]. Επιπλέον, έχει δείχθει ότι το ONOO⁻ και το προϊόν αποσύνθεσης του NO₂ προωθούν την οξείδωση της DA σε DAQ [8, 239]. Στη PD, πιστεύεται ότι τα αυξημένα επίπεδα NO[•] και ONOO⁻ συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου [240, 241].



Εικόνα 1.4.1.3 Οξειδωτικό στρες και νευροτοξικότητα

Μηχανισμοί νευροτοξικότητας της DA και νευροτοξίνες που χρησιμοποιούνται για να μιμηθούν την PD στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Η DA και οι νευροτοξίνες 6-υδροξυδωπαμίνη (6-OHDA) και η 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνη (MPTP), προκαλούν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία, την υπεροξειδωση των λιπών και την κυτταροσκελετική αποδιοργάνωση, η οποία οδηγεί στην ενεργειακή κρίση και το θάνατο των νευρώνων. Το MPTP αρχικά ενσωματώνεται στα κύτταρα της γλοίας και μεταβολίζεται σε MPP⁺. Αυτός ο μεταβολίτης μπορεί να διασχίσει τη μεμβράνη μέσω του μεταφορέα της DA (DAT) για να φθάσει τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ενώ το 6-OHDA μπορεί να διασχίσει απευθείας τη μεμβράνη μέσω του DAT [222].

Νευροτοξικότητα και ομοιόσταση Ca^{2+}

Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ελεύθερου Ca^{2+} διαδραματίζει έναν πολύπλοκο ρόλο στη σηματοδότηση του εγκεφάλου. Τα κατιόντα Ca^{2+} ρυθμίζουν τη νευρωνική πλαστικότητα, καθορίζοντας έτσι τη μάθηση, τη μνήμη και την επιβίωση των νευρώνων. Ο ομοκυτταρικός και ο ετεροκυτταρικός έλεγχος της ομοιόστασης του Ca^{2+} , έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της νευρωνικής ακεραιότητας. Οι ροές του Ca^{2+} διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης μεταξύ των ενδοκυτταρικών οργανιδίων και των διαμερισμάτων (μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικά δίκτυα), ελέγχουν διάφορες λειτουργίες και πρωτεΐνες, όπως οι υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες, τους δίαυλους ιόντων, μεταγραφικά δίκτυα, ιοντοανταλλάκτες. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ Ca^{2+} και των δραστικών ριζών οξυγόνου, συντονίζουν τη σηματοδότηση, η οποία μπορεί να είναι είτε ωφέλιμη είτε επιζήμια. Στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές, διακυβεύονται τα κυτταρικά συστήματα ρύθμισης του Ca^{2+} . Το οξειδωτικό στρες, ο διαταραγμένος ενεργειακός μεταβολισμός και οι μεταβολές των πρωτεϊνών σχετιζόμενες με νόσους, έχουν σαν αποτέλεσμα την ασβεστο-εξαρτώμενη συναπτική δυσλειτουργία, τη μειωμένη πλαστικότητα και τον κυτταρικό θάνατο των νευρώνων. Η δυσλειτουργία της ομοιόστασης του Ca^{2+} , είναι καθοριστική

για το θάνατο και τον εκφυλισμό των εγκεφαλικών κυττάρων μετά από ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, μακροχρόνιο νευροεκφυλισμό στη νόσο AD, PD, HD, σκλήρυνση κατά πλάκας, επιληπτική σκλήρυνση [242]. Παρά το ευρύ φάσμα συμπτωμάτων αυτών των ασθενειών, υπάρχουν εντυπωσιακές ομοιότητες στη μοριακή παθογένεσή τους, καθώς όλες περιλαμβάνουν τη δυσλειτουργία της ομοιόστασης του Ca^{2+} και της σηματοδότησης. Το ανώμαλο φορτίου του μπορεί να προκαλέσει το θάνατο του κυττάρου, ενεργοποιώντας πρωτεάσες, ενισχύοντας τα σήματα που οδηγούν στην ενεργοποίηση κασπασών ή ενεργοποιώντας άλλες καταβολικές διεργασίες που διαμεσολαβούνται από λιπάσες και νουκλεάσες [242].

1.4.2 Η Αλληλεπίδραση DA με την ASYN.

Η DA θεωρείται από πολλούς ερευνητές ως μία πιθανή ενδοτοξίνη [243], η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη PD. Ύστερα από τη σύνθεσή της μπορεί να ακολουθήσει διαφορετικές μεταβολικές πορείες. Μπορεί να αποθηκευτεί σε συναπτικά κυστίδια μέσω του μεταφορέα VMAT, να υποστεί οξειδωτική απαμίνωση από τις οξειδάσες των μονοαμινών, MAO [244], και να αυτο-οξειδωθεί σχηματίζοντας νευρομελανίνη, κουινόνες, ελεύθερες ρίζες και ενεργές μορφές οξυγόνου ROS [245].

Στις απολήξεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων, η DA που συντίθεται αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια μέσω του VMAT-2 μεταφορέα. Μετά την απελευθέρωσή της με εξωκυττάρωση, μπορεί να επαναπροσληφθεί από το μεταφορέα της DA, DAT (Dopamine Transporter), που εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη των προσυναπτικών άκρων των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Στη συνέχεια η DA αποικοδομείται ενζυμικά από τις οξειδάσες μονοαμινών MAO-B. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής DA εξαρτάται από την ποσότητα του DAT υποδοχέα στην πλασματική μεμβράνη καθώς και του μεταφορέα VMAT-2 στα συναπτικά κυστίδια. Όσο αυξάνεται η ελεύθερη DA στις νευρωνικές απολήξεις, τόσο αυξάνονται τα τοξικά παράγωγα και οι ROS από την οξείδωση της DA [246].

Όπως προαναφέρθηκε, στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας η DA μεταβολίζεται μέσω ενζυμικής απαμίνωσης από τις οξειδάσες. Ως αποτέλεσμα, παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) [247], το οποίο μετατρέπεται στην ιδιαίτερα τοξική ρίζα υδροξυλίου, σε μια αντίδραση που καταλύεται από δισθενή ιόντα σιδήρου συνδεδεμένα με τη νευρομελανίνη [248]. Επίσης, η DA μπορεί να υποβληθεί σε αυτο-οξείδωση παρουσία μοριακού οξυγόνου και να προκύψουν τοξικές κουινόνες, ρίζες υπεροξειδίων και H_2O_2 . Αν το H_2O_2 δε μεταβολιστεί από την υπεροξειδική δισμουτάση, τότε μπορεί παρουσία οξειδίων του αζώτου να σχηματίσει κυτταροτοξικές

υπεροξυνιτρικές ρίζες [245]. Έχει αναφερθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες και η οξειδωμένη DA επιταχύνουν και σταθεροποιούν το σχηματισμό των πρωτοϊνιδίων της ASYN, προκαλώντας οξειδωτικό στρες με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της συσσωμάτωσής της σε πρωτοϊνίδια [249]. Σε πειράματα συνέκφρασης της μεταλλαγμένης A53T ASYN και της τυροσινάσης (που σχετίζεται με την παραγωγή κατεχολαμινών και τους μεταβολίτες τους) φάνηκε αύξηση των συσσωματωμάτων ASYN με αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στο DNA και απόπτωσης [250-252].

Συμπερασματικά, είναι πιθανόν οι οξειδωμένοι μεταβολίτες των κατεχολαμινών να είναι υπεύθυνοι για την τροποποίηση της ASYN δημιουργώντας τοξικά πρωτοϊνίδια, που σύμφωνα με άλλες μελέτες μπορεί να συνδέονται στις κυτταρικές μεμβράνες αυξάνοντας τη διαπερατότητά τους. Ενδοκυτταρικά οργανίδια και συναπτικά κυστίδια είναι πιθανόν να είναι στόχοι της δράσης συγκεκριμένων πρωτοϊνιδίων. Η διάρρηξη των μεμβρανών συνεπώς οδηγεί σε ένα φαύλο κύκλο καθώς προωθεί επιπλέον την αύξηση της κυτταροπλασματικής DA. Όσον αφορά τη διάρρηξη των μιτοχονδριακών μεμβρανών μπορεί να προκληθεί μιτοχονδριακή ανεπάρκεια και άρα κυτταρικό θάνατο [246, 253]. Συν τοις άλλοις, είναι γνωστό ότι η ASYN αλληλεπιδρά με την TH, τον μεταφορέα VMAT2, τον μεταφορέα DA DAT, με την πρωτεΐνη DJ-1 αλλά και με την AADC. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι κατανοητό ότι η ASYN θα μπορούσε να σχετίζεται με την παραγωγή DA και κατά συνέπεια οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Επομένως, η μελέτη των παραγόντων που ελέγχουν τη σύνθεση, την αποθήκευση, την απελευθέρωση και την επαναπρόσληψη της DA μπορούν να συνεισφέρουν στη θεραπεία της νόσου του PD. Η αποκάλυψη της ακριβούς δράσης και ρύθμισης της DDC αναμένεται να προσφέρει διεξόδους για θεραπευτικές προσεγγίσεις περισσότερο αποτελεσματικές, αλλά και με λιγότερες παρενέργειες. Η ASYN έχει προταθεί ότι ρυθμίζει την παραγωγή της DA σε καλλιέργειες κυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασής της με την τυροσινική υδροξυλάση. Η υπερέκφραση της ASYN σε κυτταρικές καλλιέργειες, μειώνει την ενεργότητα του υποκινητή της TH, που οδηγεί με τη σειρά της σε μείωση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης της TH [254]. Η ASYN προσδένεται με την TH, περιορίζει τη φωσφορυλίωση της, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της, προωθώντας την ενεργότητα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP2A [255, 256]. Αντιστρόφως, η αποσιώπηση της ASYN οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση της TH και αύξηση της ενεργότητάς της [257]. Η ASYN αλληλεπιδρά επίσης και με την DDC. Έχει αποδειχθεί ότι, η υπερέκφραση της ASYN μειώνει την φωσφορυλίωση του ενζύμου και μειώνει την ενεργότητα του σε ντοπαμινεργικά κυτταρικά μοντέλα πιθανόν αυξάνοντας την ενεργότητα του PP2A [258]. Επιπλέον, μόλις συντεθεί η DA αμέσως εισάγεται σε κυστίδια με τη βοήθεια του μεταφορέα VMAT2. Η ASYN ρυθμίζει την λειτουργία των συναπτικών κυστιδίων αυτών και την απελευθέρωση της DA στη συναπτική σχισμή [259]. Συγκεκριμένα, έχουν προταθεί οι παρακάτω

αλληλεπιδράσεις: Όταν τα επίπεδα της ASYN είναι μειωμένα περισσότερα κυστίδια είναι διαθέσιμα για έκκριση και τα κυστίδια στη δεξαμενή ανακύκλωσης είναι μειωμένα. Σε φυσιολογικά επίπεδα ASYN, αυτή ρυθμίζει την διαθεσιμότητα των κυστιδίων στις διαφορετικές δεξαμενές καθώς και την κυστιδιακή σύντηξη. Όταν αντιθέτως, τα επίπεδα της φυσιολογικής ή μεταλλαγμένης (A53T, E46K) ASYN είναι αυξημένα τότε επικρατεί μείωση της έκκρισης DA [260]. Επίσης, μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες έχουν δείξει ότι η ASYN είναι απαραίτητη για τη γρήγορη στρατολόγηση του DAT υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια, τη μετακίνηση του μακριά από αυτήν αλλά και την ενίσχυση της ικανότητας με την οποία ο υποδοχέας επαναπροσλαμβάνει DA. Με αυτό τον τρόπο ρυθμίζεται το ντοπαμινεργικό σήμα στη σύναψη καθώς μέσω του υποδοχέα DAT, επαναπροσλαμβάνεται η DA με συμμεταφορά Na^+ και K^+ [259, 261]. Αντιθέτως, *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι δεν παρατηρούνται αλλαγές στην επαναπρόσληψη της DA από τον υποδοχέα DAT σε μύες που δεν εκφράζουν ASYN [262].

Η επιλεκτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη PD, έχει προταθεί ότι οφείλεται σε ποικίλες θεωρίες. Μία από αυτές αποτελεί το γεγονός ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι περισσότερο ευαίσθητοι στο οξειδωτικό στρες λόγω του υψηλού μεταβολισμού τους [263]. Η συμβολή της ηλικίας των ασθενών επίσης είναι καθοριστική, καθώς έχουν βρεθεί αρκετές μιτοχονδριακές DNA ελλείψεις στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες ηλικιωμένων ασθενών, κάτι που μπορεί να οδηγεί σε δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων και άρα του μεταβολισμού της ενέργειας, με αποτέλεσμα τον αυξημένο νευροεκφυλισμό στη συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου [264]. Άλλα χαρακτηριστικά των ντοπαμινεργικών νευρώνων που πιθανόν συμβάλλουν στην ευαισθησία που έχουν στον κυτταρικό θάνατο είναι η αυξημένη ποσότητα του DAT υποδοχέα σε σχέση με τον VMAT υποδοχέα με αποτέλεσμα την αυξημένη επαναπρόσληψη της DA στο κυτταρόπλασμα που δεν ακολουθείται από αντίστοιχη αποθήκευση σε κυστίδια, κάτι που οδηγεί σε αυξημένη τοξικότητα [265, 266]. Επιπλέον, χαρακτηριστικό των ντοπαμινεργικών νευρώνων είναι ο μεταφορέας ασβεστίου CaV1.3 Ca^{2+} ο οποίος δημιουργεί έναν αυτόνομο ρυθμό σύνθεσης DA καθώς τα ιόντα ασβεστίου ενεργοποιούν τη σύνθεσή της [267]. Η δυσλειτουργία της ASYN μπορεί να οδηγεί σε ανωμαλίες στο μεταβολισμό των κυστιδίων, με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταροπλασματικής DA που συντίθεται αλλά και της μείωσης εισαγωγής της σε κυστίδια. Αυτό έχει σα συνέπεια, την αύξηση τοξικών ενεργών ριζών και το νευροεκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Μια σειρά από *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η DA μπορεί να ρυθμίζει την συσσώρευση της ASYN, όταν η στοιχειομετρία ASYN-DA είναι 1:1. Η DA προκαλεί τη συσσώρευση τόσο της αγρίου τύπου όσο και της μεταλλαγμένης μορφής A53T ASYN με μια διαδικασία που εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η μεταλλαγμένη μορφή A53T έχει αυξημένη τάση συσσώρευσης παρουσία DA, όπως έχει δειχθεί από μελέτες σε κύτταρα του ανθρώπινου

νευροβλαστώματος. Επιπλέον, η ταυτόχρονη συνέκφραση ASYN και τυροσινικής υδροξυλάσης (TH) σε κύτταρα τύπου SH-SY5Y, προκάλεσε αύξηση στα κυτοσολικά επίπεδα DA. Το γεγονός αυτό, είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενδοκυτταρικών διαλυτών ολιγομερών ενδιάμεσων μορφών ASYN, τα οποία ωστόσο δεν οδηγούν σε τοξικότητα. Υπό ακαθόριστες συνθήκες η ASYN συσσωρεύεται σε μικρά ολιγομερή και πρωτοϊνίδια, τα οποία επιμηκύνονται δημιουργώντας ινίδια του αμυλοειδούς. Έπειτα από την προσθήκη DA, τα ινίδια του αμυλοειδούς αποδιοργανώνονται με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαλυτών ολιγομερών. Επίσης, η DA μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ολιγομερών ASYN που είναι ανθεκτικά σε SDS και είναι ενδιάμεσα της δημιουργίας ινιδίων του αμυλοειδούς. Ωστόσο, αυξημένη έκθεση σε DA οδηγεί στο σχηματισμό ινιδίων ASYN τα οποία είναι ασταθή. Δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητό το τι προκαλεί τη δημιουργία των ινιδίων, αλλά προτείνεται ότι είτε η DA και τα οξειδωτικά ενδιάμεσα της είτε τα ολιγομερή ASYN- DA, έχουν τη δυνατότητα να δομούν αργά και σταδιακά ινίδια του αμυλοειδούς [88]. Ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η DA αλληλεπιδρά με την ASYN επηρεάζοντας τη συσσώρευση της παραμένει αδιευκρίνιστος. Είναι πιθανόν ότι τα προϊόντα σύντηξης DA- ASYN που δημιουργούνται παρεμποδίζουν την μετατροπή των ολιγομερών σε ινίδια με αποτέλεσμα τη συσσώρευση διαλυτών ολιγομερών. Αντιθέτως, άλλες έρευνες έχουν αποτύχει να εντοπίσουν σημαντικά επίπεδα προϊόντων DA-ASYN. Υποστηρίζουν ότι ένα μοτίβο (125YEMPS129) στο C-τελικό άκρο της ASYN είναι σημαντικό για την αναστολή της δημιουργίας ινιδίων από τη DA, κάτι που αποδεικνύεται με πειράματα αφαίρεσης του μοτίβου ή μεταλλαγή εντός του μοτίβου της ASYN που είχε ως αποτέλεσμα ανάκτηση της δυνατότητας δόμησης ινιδίων του αμυλοειδούς ASYN παρουσία DA [88].

1.4.3 Σχέση DA και AD.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, εγκέφαλοι με AD εμφανίζουν μια σειρά από συμπτώματα που έχουν ως αποτέλεσμα τη γνωστική εξασθένηση, καθώς και ιστοπαθολογικά ευρήματα που σχετίζονται με παρκινσονισμό. Ως εκ τούτου, περίπου το 35 με 40% των ασθενών με AD εμφανίζουν συν τοις άλλοις και εξωπυραμιδικά συμπτώματα, δηλαδή διαταραχές κινητικότητας που συμπεριλαμβάνουν δυστονία, παρκινσονισμό, βραδυκινησία, τρόμο και δυσκινησία. Η παρατήρηση αυτή, υποστηρίζει τη θεωρία ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες υφίστανται εκφυλιστικές μεταβολές κατά το μηχανισμό παθογένεσης της AD [268]. Παρατηρήθηκαν αρκετές παθολογικές αλλαγές στους νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας, όπως νευροϊνιδιακοί κόμβοι, πλάκες του αμυλοειδούς, απώλεια μυελίνης στους νευράξονες και στους δενδρίτες, νευρωνικός θάνατος, καθώς και μείωση των επιπέδων DA. Οι αλλαγές

αυτές προτείνουν τη σαφή εμπλοκή της DA στην παθοφυσιολογία την γνωστικής εξασθένησης και των μη- γνωστικών συμπτωμάτων που σχετίζονται με την AD [223].

Οι διάφοροι τύποι εγκεφαλικών κυττάρων, φαίνεται να επιδεικνύουν διαφορετική ευαισθησία στα επίπεδα τοξικότητας του Αβ. Τα χολινεργικά κύτταρα αποτελούν τα πιο ευαίσθητα και τα σεροτονεργικά ακολουθούν. Αντιθέτως, τα GABA- εργικά κύτταρα φαίνεται είναι τα λιγότερο ευάλωτα στην παθολογία των ολιγομερών. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες έχουν πολλές αλληλεπιδράσεις με τα Αβ πεπτίδια, γι' αυτό το λόγο δείχνουν μια ενδιάμεση κατάσταση ευαισθησίας σε αυτά [269, 270]. Όπως ήδη αναφέρθηκε, το ντοπαμινεργικό σύστημα υποβάλλεται σε βιοχημικές τροποποιήσεις κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της φυσιολογικής γήρανσης. Μερικά από τα πιο συχνά χαρακτηριστικά ενός εγκεφάλου σε κατάσταση γήρανσης είναι η μειωμένη απελευθέρωση DA από τις απολήξεις των νευρώνων, η μειωμένη έκφραση των ντοπαμινεργικών υποδοχέων και συγκεκριμένα των D2, καθώς και του μεταφορέα της DA, DAT σε μια δομή των βασικών γαγγλίων, στον υπόκαμπο και στο μετωπιαίο λοβό [271]. Στη συνέχεια, η συσχέτιση με τη φυσιολογικά μειωμένη έκλυση γλουταμινών από το μετωπιαίο και προμετωπιαίο λοβό, τον υπόκαμπο και την αμυγδαλή, προκαλεί περαιτέρω μείωση της απελευθέρωσης της DA, έχοντας σαν αποτέλεσμα την απάθεια, διαταραχές στο βάδισμα και μείωση των εκτελεστικών λειτουργιών, χαρακτηριστικά τα οποία συναντώνται σε ηλικιωμένους και σε ασθενείς με AD. Έχει προταθεί, πως τα χαρακτηριστικά αυτά, είναι συνέπειες βλάβης της μεταβίβασης της DA [272]. Ως εκ τούτου, οι πιθανές διακυμάνσεις του νευροδιαβιβαστή της DA, είναι σε άμεσο συσχετισμό με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών. Όσο πιο νωρίς εμφανιστεί η βλάβη αυτή, τόσο πιο ραγδαία θα είναι η έκπτωση της γνωστικής λειτουργίας. Δεδομένα από έρευνες σε διαγονιδιακά ποντίκια, υπογραμμίζουν την άμεση διασύνδεση της ντοπαμινεργικής παθολογίας και της εναπόθεσης των Αβ ολιγομερών. Η διασύνδεση αυτή αποτελεί αιτιολογία δυσλειτουργίας της ντοπαμινεργικής δράσης [273]. Η επαναπρόσληψη της DA εμπλέκεται στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης σε πειραματικά μοντέλα AD μυών. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση της εμπλοκής της DA σε γνωστικές λειτουργίες [274]. Άλλες μελέτες έχουν συσχετίσει τον προστατευτικό ρόλο της DA στον εγκέφαλο και της έχουν αποδοθεί αντι-αμυλοειδογόνες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε εγκεφάλους μυών [275]. Πρόσφατα μελέτες σε εγκεφάλους με AD, αναφέρουν αξιοσημείωτη μειωμένη έκφραση και των δύο υποτύπων των DA υποδοχέων (D1 και D2) στον προμετωπιαίο φλοιό και στον υπόκαμπο [276, 277]. Επιπλέον, στον επικλινή πυρήνα παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των υποδοχέων, κυρίως του D2, του μεταφορέα της DA, DAT, καθώς και της υδροξυλάσης της τυροσίνης [278-281]. Επιπλέον, σε πρόσφατες μελέτες απεικόνισης, παρατηρήθηκε ατροφία αυτού του πυρήνα σε μια ομάδα ασθενών με καθυστερημένη

έναρξη της AD, αλλά όχι σε ασθενείς με πρώιμη έναρξη AD [282]. Οι ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν σε ασθενείς με AD, έδειξαν απροσδόκητες θετικές επιδράσεις των ντοπαμινεργικών φαρμάκων σε μηχανισμούς φλοιώδους νευροδιαβίβασης και συναπτικής πλαστικότητας, καθώς και στις γνωστικές επιδόσεις, υποδηλώνοντας πιθανές θεραπευτικές επιδράσεις για αυτά τα φάρμακα στη θεραπεία της AD [223, 283, 284].

Υπάρχουν δύο πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι για την ντοπαμινεργική δυσλειτουργία στις πρώιμες φάσεις της νόσου. Τα πεπτίδια του αμυλοειδούς προκαλούν παθογένεση στη συναπτική πλαστικότητα με αλλαγές στην έκκριση γλουταμικού, εξασθένηση της μακροχρόνιας μνήμης, μακροχρόνια κατάθλιψη. Επίσης, ενεργοποιούν ενζυμικές οδούς, που οδηγούν στην απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο [285]. Όλα τα παραπάνω γεγονότα λαμβάνουν μέρος στις γλουταμινεργικές συνάψεις. Δεδομένα υποστηρίζουν πως, οι αλλαγές αυτές μπορούν να γίνουν και στους χολινεργικούς νευρώνες, το οποίο θα είχε σαν αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του φυσιολογικού μεταβολισμού των κυττάρων, της σύνθεσης του μεταφορέα, μέχρι και το νευροεκφυλισμό [286, 287]. Πολλές επιπτώσεις των ολιγομερών του αμυλοειδούς αφορούν και τους νικοτινικούς υποδοχείς [288]. Οι νευρικοί νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChR) εντοπίζονται στο προσυναπτικό άκρο, όπου ρυθμίζουν τη νευροδιαβίβαση [289]. Ο κύριος ρόλος των nAChR στον εγκέφαλο, είναι να επιτρέπουν στην ακετυλοχολίνη να συμμετέχει στην προσοχή, τη μάθηση και τη μνήμη, μέσω των $\alpha 4\beta 2$ και $\alpha 7$ υπομονάδων τους. Οι υπομονάδες αυτές εντοπίζονται συν τοις άλλοις και σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Ο εντοπισμός των $\alpha 7$ nAChR στο προσυναπτικό άκρο, αυξάνει την πιθανότητα της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, ενώ ο εντοπισμός τους στο μετασυναπτικό άκρο ενεργοποιεί μεταβολικά μονοπάτια μέσω αύξησης των επιπέδων Ca^{2+} , τα οποία σχετίζονται με την νευρωνική ομοιόσταση, τη συναπτική πλαστικότητα, τη μάθηση και τη μνήμη [290]. Έχει προταθεί πως πεπτίδια του αμυλοειδούς έχουν την ικανότητα να προσδένονται στους $\alpha 7$ nAChR [291]. Η ισχυρή αυτή αλληλεπίδραση, μπορεί να προκαλέσει ενδοκυτταρική αύξηση των επιπέδων του Ca^{2+} , καθώς και την ενεργοποίηση του καταρράκτη ERK- MPK. Οι δύο αυτές συνέπειες της αλληλεπίδρασης του Αβ με τους $\alpha 7$ nAChR, επιδρούν στη ρύθμιση της λειτουργίας των συνάψεων στους νευρώνες του ιπποκάμπου, καθώς και στη μνήμη και τη μάθηση. Αντιθέτως, η παρατεταμένη έκθεση σε πεπτίδια του αμυλοειδούς, μπορεί να αντιστρέψει το θετικό αυτό αποτέλεσμα και να οδηγήσει στη μείωση των νευρικών συνάψεων και στην εξασθένηση της μνήμης και της μάθησης [292]. Από το τελευταίο, συμπεραίνεται πως η δυσλειτουργία της DA, τουλάχιστον στα πρώιμα στάδια της AD, θα μπορούσε να είναι συνέπεια της παραγωγής Αβ πεπτιδίων και της παρατεταμένης αλληλεπίδρασης με τους $\alpha 7$ nAChR. Έτσι, η παρατεταμένη έκθεση σε Αβ, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απελευθέρωσης του γλουταμικού και

του GABA. Σα συνέπεια αυτού είναι η μείωση της πιθανότητας έκλυσης DA στον προμετωπιαίο λοβό και τον ιππόκαμπο και τελικά, την εξασθένηση της προσοχής, της μνήμης και των εκτελεστικών λειτουργιών. Στη συνέχεια, η προοδευτική μείωση της απελευθέρωσης γλουταμικού, θα μείωνε και το ερέθισμα για την απελευθέρωση της DA στον επικλινή πυρήνα, που έχει σα συνέπεια την απάθεια και την υποκινητικότητα [293]. Σε μεταγενέστερα στάδια, η παρατεταμένη δυσλειτουργία των νικοτινικών υποδοχέων στη μέλαινα ουσία και η απενεργοποίηση της οδού ERK- MAPK, ευνοεί την υπερφωσφορυλίωση της κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης tau, με νευροεκφυλισμό και κυτταρικό θάνατο.

Μία εναλλακτική υπόθεση προέρχεται από μελέτες που αφορούν την εσφαλμένη πτύχωση και την παθολογική συσσώρευση πρωτεϊνών. Πρόσφατα αποδείχθηκε, πως τα αμυλοειδή επάγουν τη συσσωμάτωση και άλλων πρωτεϊνών αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους, όπως η ASYN. Η συσσωμάτωση που προκαλείται από αυτή την αλληλεπίδραση, έχει σα συνέπεια το σχηματισμό δομών, τα οποία με τη σειρά τους, θα σχηματίσουν κανάλια διαπερατά από ιόντα, ιδιαίτερα για το Ca^{2+} , το οποίο όπως έχει αναφερθεί παίζει ρόλο στους μηχανισμούς νευροεκφυλισμού [294].

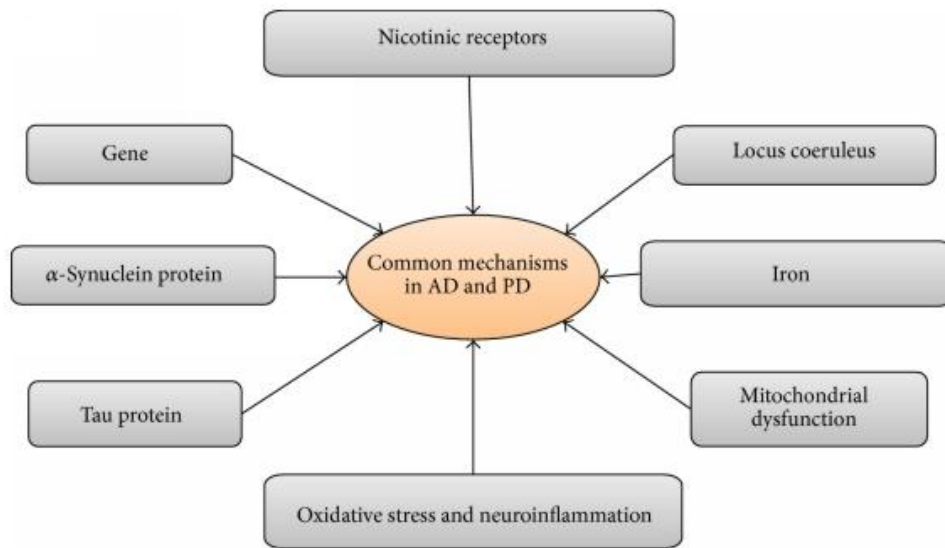
Επιπλέον, έρευνες πραγματοποιήθηκαν σε Tg2576 διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία υπερκφράζουν την ανθρώπινη πρωτεΐνη APP695 με την μετάλλαξη “Swedish”, η οποία εμφανίζει συμπεριφορικές και ιστοπαθολογικές ανωμαλίες που προσομοιάζουν στην πρώιμη μορφή της AD. Στους εγκεφάλους των αυτών των διαγονιδιακών μυών, παρατηρήθηκε απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στην κοιλιακή καλυπτρική περιοχή στην πρώιμη μορφή της νόσου, πριν την εμφάνιση των αμυλοειδικών πλακών, σε αντίθεση με τον ιππόκαμπο που δεν παρατηρήθηκε κυτταρικός θάνατος. Η προοδευτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη εκροή DA στον ιππόκαμπο και στον επικλινή πυρήνα, κάτι το οποίο επηρεάζει τη συναπτική πλαστικότητα, την απόδοση της μνήμης και τη διαδικασία της ανταμοιβής [295]. Αυτές οι παρατηρήσεις, θα μπορούσαν να συνδεθούν με την κλινική ντοπαμινεργική συμπτωματολογία, η οποία περιλαμβάνει την απάθεια ή την ανηδονία. Τα χαρακτηριστικά αυτά, έχουν προταθεί να αυξάνουν τον κίνδυνο για AD [296-298], διότι σχετίζονται με το φορτίο του Αβ.

Συνοψίζοντας, οι παθογενετικοί μηχανισμοί νευροεκφυλισμού που σχετίζονται με τη βιοχημεία της DA, συνδέονται με την απώλεια γνωστικών λειτουργιών και νευρωνικό θάνατο. Το γεγονός αυτό δίνει έμφαση στην εμπλοκή του νευροδιαβιβαστή της DA στους βασικούς μηχανισμούς ανάπτυξης νευροεκφυλιστικών νόσων.

1.5 AD vs. PD.

Σημειώνεται, ότι η DA, όπως αναφέρθηκε, διακατέχει ενεργό ρόλο στη PD, αλλά υπάρχουν πλέον πληθώρα δεδομένων, τα οποία συνδέουν την ντοπαμινεργική δυσλειτουργία με τους παθογενετικούς μηχανισμούς της AD. Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι σπάνια θα αποδοθούν σε μετάλλαξη σε ένα μόνο γονίδιο. Η αιτιοπαθολογία των νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως της AD και PD, αποτελείται από μια πληθώρα βιοχημικών, κυτταρικών, γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η ερμηνεία όμως, του τεράστιου όγκου νέων δεδομένων που προέρχεται από τη χρήση νέων τεχνολογιών αποσαφήνισης των παραπάνω μοριακών μηχανισμών, παραμένει μια ισχυρά μελλοντική πρόκληση για την εξακρίβωση του σαφή ρόλου των εμπλεκόμενων μορίων, που ευθύνονται για τις δυσλειτουργίες που οδηγούν στο νευρωνικό θάνατο [9].

Παρά το γεγονός ότι οι δύο νόσοι έχουν ξεχωριστούς μοριακούς μηχανισμούς αιτιολογίας, αφορούν διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου και παρουσιάζουν διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά, έχουν μεγάλη αλληλοεπικάλυψη στην παθολογία, στους γενετικούς παράγοντες επικινδυνότητας και στους μηχανισμούς νευροεκφυλισμού (Πίνακας 4.1) [9, 299]. Για παράδειγμα, η συσσώρευση της ASYN και η παθολογία των σωματίων Lewy, χαρακτηριστικά της PD, είναι παρόντα και σε ανθρώπινους εγκεφάλους με AD και εμπλέκονται στο σχηματισμό ανώμαλων συνάψεων [300, 301]. Επίσης, αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει πολυμορφισμούς (SNPs) στο γενετικό τόπο MAPT, που σχετίζεται με τις PD και AD, γεγονός που υποδηλώνει ότι ένας κοινός γενετικός παράγοντας μπορεί να υποβάλει ένα άτομο σε κίνδυνο για αμφότερες τις ασθένειες [302]. Άλλες γενετικές παραλλαγές, συμπεριλαμβανομένων των PON1, GSTO και NEDD9, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο PD και AD, επιβεβαιώνουν τη γενετική επικάλυψη μεταξύ τους [299]. Δεν αποτελεί έκπληξη, οι μηχανισμοί που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, τη νευροφλεγμονή, τη διαταραχή στη σηματοδότηση της ινσουλίνης, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την ανισορροπία της ομοιόστασης του σιδήρου, καθώς και τους νικοτινικούς υποδοχείς, να εμπλέκονται στην παθογένεση της AD και PD [299]. Μια συστηματική προσέγγιση, έδειξε πως μερικοί πολυμορφισμοί της PD (cisSNPs, cis- acting SNPs), συσχετίστηκαν με τους γενετικούς τόπους CRHR1, LRRC37A4 και MAPT που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 17q21 και υποδηλώνουν κίνδυνο για AD [303]. Επιπλέον, ορισμένα γνωστά γονίδια, τα οποία ήδη έχουν συνδεθεί με τις ασθένειες AD και PD και επτά άγνωστα γονίδια που συμπεριλαμβάνουν τα ROS1, FMN1 ATP8A2, SNORD12C, ERVK10, PRS και C7ORF49, ίσως συσχετίζονται και με τις δύο ασθένειες [304]. Ακόμη, ταυτοποιήθηκαν και γονίδια που σχετίζονται με την DNA επιδιόρθωση, το μεταβολισμό του RNA και το μεταβολισμό της γλυκόζης σε AD και σε PD [305].



Πίνακας 4.1: Κοινοί μηχανισμοί σε AD και PD

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως έχει πρωτοαναφερθεί με λεπτομέρεια, οι δύο νευροεκφυλιστικές ασθένειες του ΚΝΣ AD και PD, σχετίζονται με τη γήρανση και χαρακτηρίζονται από θεμελιώδη βιοχημική δυσλειτουργία πληθυσμών νευρώνων, με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η περίπλοκη σχέση βιοχημικών και μοριακών αλλοιώσεων, οι οποίες μπορεί να προκαλούνται μέσω της πολυδιάστατης και πολυσύνδετης αλληλεπίδρασης του γενετικού υποβάθρου και του περιβάλλοντος, θεωρείται ότι αποτελεί την αιτιοπαθολογία του νευροεκφυλισμού.

Η AD, είναι η πιο συνηθισμένη αιτία της άνοιας και χαρακτηρίζεται από προοδευτική έκπτωση της νοητικής λειτουργίας και απώλεια νευρώνων που συνοδεύεται από το σχηματισμό εξωκυττάρων πλακών του αμυλοειδούς (Αβ) και ενδοκυττάρων νευροϊνιδιακών κόμβων (NTFs) υπερφωσφορυλιωμένης tau. Το Αβ προέρχεται από την ενζυμική πρωτεόλυση από εκκριτάσες (β και γ εκκριτάση) ενός πρόδρομου μεγαλύτερου μορίου. Το αρχικό αυτό πρόδρομο μόριο είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η APP. Η πρωτεΐνη tau προσδένεται και σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους στην φυσιολογική της μορφή, αλλά η υπερφωσφορυλίωσή της οδηγεί σε συσσώρευση της και σε σχηματισμό νευροϊνιδιακών κόμβων, με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιούνται οι μικροσωληνίσκοι και να θέτει σε κίνδυνο την νευρωνική λειτουργία. Εκτιμάται πως αφορά περίπου 47 εκατομμύρια ανθρώπων παγκοσμίως με τεράστιες επιπτώσεις στην υγεία, την κοινωνία και την οικονομία. Εκτιμάται πως η ετήσια δαπάνη για τη AD, ανέρχεται στα 605 δισεκατομμύρια δολάρια. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει κάποια θεραπεία, η οποία εμποδίζει ή επιβραδύνει την πρόοδο της ασθένειας [48].

Η PD είναι μια κύρια νευροεκφυλιστική νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη συσσώρευση τοξικών μορφών ASYN στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου. Ως αποτέλεσμα, επέρχεται ο θάνατος τους και σημειώνεται η παρουσία έγκλειστων πρωτεϊνικών σωματίων Lewy στους επιζώντες νευρώνες. Ο νευροδιαβιβαστής DA σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την παθογένεση της νόσου καθώς τα μειωμένα επίπεδα του είναι αυτά που οδηγούν στην εμφάνιση των κινητικών συμπτωμάτων. Τα αυξημένα επίπεδα της ASYN ευθύνονται για τη μετάδοση της παθολογίας της νόσου. Οι ελαττωματικές και μη ορθά πτυχωμένες πρωτεΐνες που δεν αξιοποιούνται από το κύτταρο δημιουργούν συσσωματώματα και απομακρύνονται μέσω των συστημάτων αποικοδόμησης, το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και το σύστημα αυτοφαγίας και λυσοσώματος. Η δράση τους είναι σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην εξέλιξη της παθογένειας. Εκτιμάται ότι, 10 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από PD. Ο συνδυασμός άμεσων και έμμεσου κόστους για τη νόσο, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας, κοινωνικής

ασφάλισης και απώλειας εισοδήματος λόγω ανικανότητας εργασίας, ανέρχεται στα 25 δισεκατομμύρια στις Η.Π.Α ετησίως.

Η εισαγωγή των μεθόδων απεικόνισης του εγκεφάλου επέτρεψε την παρακολούθηση της εξέλιξης των νόσων σε ασθενείς εν ζωή. Επιπλέον, οι τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, όπως η μεταγραφωματική, η πρωτεομική, μεταβολομική και οι υπολογιστικές προσεγγίσεις, επιτρέπουν την αξιολόγηση των βιολογικών συστημάτων και των συμπεριφορών τους, επιτρέποντας τη διεξαγωγή ερευνών σε επίπεδο συστήματος [306]. Από την άλλη πλευρά, η δυνατότητα που αποκτήθηκε πρόσφατα, να παράγονται επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα από ανθρώπινους ιστούς κατέστησε δυνατή την παραγωγή κυτταρικών σειρών ειδικών για μια ασθένεια, αναπαράγοντας ανθρώπινα μοντέλα ασθενειών. Ως εκ τούτου αποδεικνύεται διαρκώς, ότι πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες δεν είναι απλώς ασθένειες των νευρώνων που πεθαίνουν. Πολλά, μη νευρικής προέλευσης κύτταρα, όπως τα κύτταρα γλοίας, τα οποία είναι σε αφθονία στον εγκέφαλο και στο ΚΝΣ, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ασθένειες [307]. Παρά το γεγονός ότι, οι δύο ασθένειες έχουν διαφορετικά κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, μοιράζονται πολλούς κοινούς μοριακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς παθογένειας. Για παράδειγμα, την έκφραση και τη λειτουργία της ASYN και της πρωτεΐνης τ (tau), μηχανισμούς το οξειδωτικού στρες, της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της επίδρασης του σιδήρου και την εμπλοκή του υπομέλανα τύπου. Οι κοινοί παθογενετικοί μηχανισμοί των δύο ασθενειών, υποστηρίζονται από πολυάριθμες πειραματικές προσεγγίσεις που πραγματοποιούνται μέσω βιοχημικών, γενετικών και μοριακών μελετών. Ως εκ τούτου, υπάρχουν πολλές αναφορές, οι οποίες υποστηρίζουν την καταστολή ή και τη θεραπεία των ασθενειών, μέσω αναστολής της ASYN και της τ (tau), μέσω ενεργοποίησης του αντιοξειδωτικού συστήματος, ή μέσω επιδιόρθωσης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Επομένως, η κατανόηση της σύνδεσης των ασθενειών σε συστημικό επίπεδο, αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την επιτάχυνση της ανακάλυψης νέων θεραπειών και για τις δύο νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών και των φροντιστών τους, τη μείωση των κοινωνικών και οικονομικών επιπτώσεων που προκαλούν οι ασθένειες αυτές.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση και η περαιτέρω κατανόηση των κοινών μοριακών μηχανισμών που διασυνδέουν τις νευροεκφυλιστικές διαδικασίες των AD και PD. Ως μοχλός στην προσπάθεια κατανόησης των παραπάνω διαδικασιών, χρησιμοποιήθηκε το βιοσυνθετικό ένζυμο της DA, η DDC, αλλά και οι εναλλακτικές ισομορφές του, ενώ όπως έχει προαναφερθεί υπάρχει πληθώρα πληροφοριών, που συνδέει τη DA με νευροεκφυλισμό. Σχεδόν ανύπαρκτα είναι τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία διασυνδέουν την έκφραση του βιοσυνθετικού ενζύμου της DA, την DDC, με την επαγωγή βιοχημικών φαινομένων που διέπουν τα

νευροεκφυλιστικά φαινόμενα. Για τον παραπάνω λόγο, κύριος σκοπός της έρευνάς μας, ήταν η μελέτη της σχέσης της έκφρασης της ανθρώπινης L- DOPA αποκαρβοξυλάσης και των ισομορφών αυτής με την πρωτεολυτική επεξεργασία και έκφραση της APP. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι επιδράσεις παραγόντων όπως Carbidopa, DA, σταυροσπορίνη στο παραπάνω πειραματικό μοντέλο. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του φυσικού αναστολέα της DDC, Annexin V, στις παραπάνω διαδικασίες.

Η παγκόσμια βιβλιογραφία αποκαλύπτει τμηματικά την ενδογενή μοριακή και βιοχημική «συγγένεια» των μηχανισμών που οδηγούν σε νευροεκφυλισμό. Για το λόγο αυτό, η αποσαφήνιση του ρόλου της σχέσης των μεμονωμένων μορίων που εμπλέκονται στις παραπάνω διαδικασίες, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική. Επισημαίνεται, πως είναι σχεδόν ανύπαρκτα τα ερευνητικά δεδομένα που σχετίζονται με την αναγνώριση του βιολογικού ρόλου της DDC, της DDC-3 και της Alt- DDC. Ωστόσο, πληθώρα πειραματικών δεδομένων έχουν αποδείξει την εμπλοκή του ενζύμου αυτού στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και η αποσαφήνιση του ρόλου του, πιθανώς να αποτελέσει κίνητρο για την ανακάλυψη νέων πιο ολοκληρωμένων και εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών νόσων. Το αντικείμενο της έρευνας αυτής, στοχεύει τη συγκεκριμένη πτυχή. Συνοπτικά, κύριος στόχος της παρούσας εργασίας, ήταν να μελετηθεί η επίδραση του βιοσυνθετικού ενζύμου της DA και των ισομορφών αυτού, με την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς, και ο βαθμός συμμετοχής του στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP. Η συνεχής αποσαφήνιση των κοινών μοριακών μηχανισμών που προκαλούν τις ασθένειες αυτές, θα μπορούσαν να προτείνουν κοινές στρατηγικές παρέμβασης με απώτερο στόχο την ανάπτυξη νέων θεραπειών και να ωφελήσουν τους ασθενείς που πάσχουν από αυτές τις ασθένειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά.

Όλα τα άλλα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις ακόλουθες εταιρίες:

- Το διάλυμα ακρυλαμίδης/N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης (Bis) 30 % (29:1) από την ALTERCHEM.
- Το θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (SDS), το Τρις-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο (Tris), η χρωστική βρωμοφαινόλη μπλε, η χρωστική Ponceau S, το απορρυπαντικό Tween-20 και η β-μερκαπτοαιθανόλη αγοράστηκαν από τη SERVA.
- Η N,N,N',N'-τετρα-μεθυλο-διαμίνη (TEMED) προέρχεται από την FLUKA.
- Το υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) αγοράστηκε από την εταιρία FERAK.
- Οι χημικές ουσίες 2,2'-δι-νιτροφαινυλ-3,3'-[3,3'-διμεθοξυ-4,4'-διφαινυλ-χλωριούχο τετραζόλιο (NBT), 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ φωσφορικό μετά της τολουιδίνης άλας (BCIP) από την Applichem.
- Τα υλικά κυτταροκαλλιιεργειών DMEM, ο ορός μοσχαριού (FBS), και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη από τη BioSera.
- Η γλυκίνη, μεθανόλη, το DMSO (Dimethyl Sulfoxide), η θρυψίνη, το NaCl και η νεομυκίνη (G418 disulfate salt) από τη SIGMA.
- Η χρωστική Trypan blue αποκτήθηκε από την GIBCO.
- Η αλβουμίνη ορού βοός (BSA) αγοράστηκε από την PAA.
- Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0.45 μm), όπως και οι συσκευές ηλεκτροφόρησης προμηθεύτηκαν από την BIO-RAD.
- Το χαρτί χρωματογραφίας Whatman 3M προμηθεύτηκε από την εταιρία MACHEREY- NAGEL.
- Το αντιδραστήριο Bradford αγοράστηκε από την εταιρεία Bio-Rad Laboratories (Milan, Italy).
- Οι πρωτεΐνες μάρτυρες με γνωστές μοριακές μάζες (για SDS ηλεκτροφόρηση) αγοράστηκαν από την FERMENTAS και την NIPPON.

Αντισώματα

Τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, εντοπίζουν α) τον επίτοπο του πεπτιδίου του αμυλοειδούς επί της APP, β) τον επίτοπο της καρβοξυτελικής περιοχής της APP και παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο της Αν. Καθηγήτριας Δρ Δ. Βασιλακοπούλου.

Τα αντισώματα έναντι των IgG αιγός (alkaline-phosphatase conjugated rabbit anti-goat IgG) και κουνελιού (alkaline-phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG) συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση αποκτήθηκαν από τη SIGMA (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.2 Διαλύματα.

1. Διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων για SDS-PAGE 1x (Διάλυμα Φόρτωσης)

10 mM Tris-βάση

10 % (κ.ο) γλυκερόλη

2 % (κ.β) SDS

5 % (κ.ο) β-μερκαπταιθανόλη

0,002 % χρωστική Bromophenol blue

2. Πήκτωμα διαχωρισμού SDS-PAGE (Separating Gel Buffer)

0,375 M Tris-HCl, pH 8,8

0,1 % (κ.β.) SDS

0,1 % (κ.β.) APS

0,04 % (κ.ο.) Temed

3. Πήκτωμα συμπύκνωσης SDS-PAGE (Stacking Gel Buffer)

0,125 M Tris- HCl, pH 6,8

0,1 % (κ.β.) SDS

0,1 % (κ.β.) APS

0,1 % (κ.ο.) Temed

4. Διάλυμα ηλεκτροδίων SDS-PAGE (Running Buffer)

25 mM Tris-HCl, pH 8,3

0,192 M γλυκίνη

0,1 % (κ.β.) SDS

5. Διάλυμα ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (Transfer Buffer)

48 mM Tris-HCl, pH 9,2

39 mM γλυκίνη

20 % (κ.ο.) μεθανόλη

3,75 % (κ.β.) SDS

6. Διάλυμα χρώσης Ponceau S

0,5 % (κ.β.) Ponceau S

5 % TCA

7. Διάλυμα κορεσμού ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (Blocking Solution)

1 % (κ.β.) BSA

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 mM NaCl

0,05 % (κ.β.) Tween 20

8. Διάλυμα πλύσεων ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (TNT)

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 mM NaCl

0,05 % (κ.β.) Tween 20

9. Διάλυμα ανάπτυξης ανοσοαντίδρασης (Alkaline Phosphatase Buffer)

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

10. Διάλυμα χρωματικής ανοσοαντίδρασης (Development Buffer)

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

0,033 % (κ.β.) NBT

0,0165 % (κ.β.) BCIP

11. Διάλυμα Bradford

0,01 % (κ.β.) Coomassie Brilliant Blue G-250

4,7 % (κ.ο) αιθανόλη

8,5 % (κ.ο) ορθοφωσφορικό οξύ

12. Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

89 % DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

10 % FBS (Εμβρυϊκός Ορός Βοός)

1 % μίγμα αντιβιοτικών (10.000 units πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης)

13. PBS (1x) (Phosphate Buffered Saline)

0,137 M NaCl

3,2 mM KCl

1,5 mM KH_2PO_4

10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

14. Διάλυμα παγώματος κυττάρων (Freezing Medium)

90 % FBS

10 % DMSO

15. Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επιμολυσμένων κυτταρικών κλώνων

89 % DMEM

10 % FBS (εμβρυϊκός ορός βοός)

1 % μίγμα αντιβιοτικών (10.000 units πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης)

200 µg/ml G418 sulfate

16. Διάλυση λύσης κυττάρων RIPA

50 mM tris (pH 7,4)

150 mM NaCl

250 mM EDTA (pH 8)
15 mM Triton X (10%)
1 mM Sodium vanadate
1 mM PMSF

3.3 Κυτταρικές Σειρές.

Για να μελετηθεί ο ρόλος της DCC στην πρωτεολυτική διαδικασία της APP, η κυτταρική σειρά CHO που χρησιμοποιήθηκε, αποκτήθηκε από την ATCC (American Type Culture Collection):

CHO (Chinese Hamster Ovary): Τα κύτταρα CHO (Chinese Hamster Ovary) αποτελούν μία κυτταρική σειρά προερχόμενη από την ωοθήκη του κινέζικου ενήλικου χάμστερ. Χρησιμοποιούνται συχνά στη βιολογική και ιατρική έρευνα και εμπορικά για την παραγωγή θεραπευτικών πρωτεϊνών. Η χρησιμοποίησή τους άρχισε τη δεκαετία του 1960. Τα κύτταρα CHO χρησιμοποιούνται σε μελέτες γενετικής, έλεγχου τοξικότητας, διατροφής και έκφρασης γονιδίων- ιδιαίτερα για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Σήμερα, τα κύτταρα CHO αποτελούν τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα κύτταρα θηλαστικών για τη βιομηχανική παραγωγή ανασυνδυασμένων θεραπευτικών πρωτεϊνών. Τα CHO ήταν από τα πρώτα κύτταρα θηλαστικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών. Η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων κυτταρικών σειρών για την παραγωγή θεραπευτικού ενδιαφέροντος πρωτεϊνών, αποτέλεσε σταθμό στην επιστημονική κοινότητα. Είναι γνωστό ότι παλαιότερα χρησιμοποιούνταν βακτήρια ως συστήματα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ωστόσο η ανάγκη παραγωγής πρωτεϊνών οι οποίες απαιτούν ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο μετά τη μετάφραση προκειμένου να γίνουν βιολογικά λειτουργικές, οδήγησε στη χρήση συστημάτων ευκαρυωτικών κυττάρων. Κατά την καλλιέργειά τους, αναπτύσσονται σε ένα μονόστιβο στρώμα. Για την ανάπτυξή τους απαιτούν το αμινοξύ προλίνη στο θρεπτικό τους υλικό. Τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν τη DDC και τους μεταφορείς ντοπαμίνης DAT και VMAT-2 και έτσι αποτελούν ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της DDC.

Τροποποιημένες κυτταρικές σειρές:

Οι παρακάτω κυτταρικές σειρές παρασκευάστηκαν στο εργαστήριό μας και χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη αντιβιοτικού 200 µg/ml G418 στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

CHO/DDC: Κυτταρική σειρά CHO επιμολυσμένη με το cDNA της ανθρώπινης DDC.

CHO/DDC-3: Κυτταρική σειρά CHO επιμολυσμένη με το cDNA του εναλλακτικού μεταγράφου DDC-3.

CHO/Alt-DDC: Κυτταρική σειρά CHO επιμολυσμένη με το cDNA του εναλλακτικού μεταγράφου Alt-DDC.

CHO/A5: Κυτταρική σειρά CHO επιμολυσμένη με το cDNA της Αννεξίνης V.

CHO/ DDC- A5: Κυτταρική σειρά CHO διπλά επιμολυσμένη με το cDNA της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης DDC, καθώς και με το cDNA της Αννεξίνης V.

3.4 Καλλιέργεια Ευκαρυωτικών Κυττάρων *in vitro*.

Σε όλα τα στάδια που περιγράφονται παρακάτω εργαζόμαστε μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow) κάτω από ασηπτικές συνθήκες και με όλα τα σκεύη ή υλικά και τα ειδικά δοχεία καλλιέργειας (τρυβλία ή φλάσκες) που χρησιμοποιούνται να είναι αποστειρωμένα.

Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% συμπληρωματικό ορό εμβρύου βοοειδούς FBS (που περιέχει τους κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες) και μίγματος αντιβιοτικών πενικιλίνης–στρεπτομυκίνης 1% (v/v). Κάθε φορά πριν από την έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων, ο ίδιος ο θάλαμος νηματικής ροής, είχε εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UVC λαμπτήρας) για 30 περίπου λεπτά για την αποστείρωση του χώρου, ενώ η αποστείρωση περιορισμένου χώρου (τοπική) πραγματοποιήθηκε με διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v). Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 37° C, με επίπεδο CO₂ 5% και σχετική υγρασία 95%.

3.4.1 Παρασκευή Θρεπτικού Υλικού.

Ως θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Το θρεπτικό υλικό αγοράστηκε από την εταιρεία BioSera ως ήδη αποστειρωμένο από τον κατασκευαστή (Gibco™). Στο DMEM, προστέθηκαν ορός και αντιβιοτικά μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες, και τελικά το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είχε την εξής σύσταση: 89 % DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, από την εταιρεία Gibco™), 10 % FBS (Fetal Bovine Serum, από την εταιρεία Sigma-Aldrich) και 1 % μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνη (επίσης από την εταιρεία Sigma-Aldrich). Το θρεπτικό υλικό (DMEM) αποτελεί την κύρια πηγή γλυκόζης και αμινοξέων για τα κύτταρα, ενώ ο ορός (FBS) περιέχει τους αυξητικούς παράγοντες που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό τους. Ο ορός, πριν από την πρώτη χρήση του, πρέπει να απενεργοποιηθεί με θέρμανση για 30 λεπτά στους 56°C και να διαμοιραστεί σε ίσα κλάσματα (aliquots), τα οποία πριν την τοποθέτησή τους μέσα στο DMEM πρέπει

να φιλτραριστούν για την αποφυγή εισόδου συσσωματωμάτων του ορού. Το θρεπτικό υλικό παρασκευάζεται πάντα μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4 °C. Επιπλέον, προστέθηκε αντιβιοτικό συγκέντρωσης 200 µg/ ml G418 στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, για την ανάπτυξη και την επιλογή των κλώνων που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και μας ενδιαφέρει να επιβιώσουν, δηλαδή των κυτταρικών σειρών: CHO/DDC, CHO/ DDC-3, CHO/ alt- DDC.

3.4.2 Απόψυξη Κυττάρων από το Υγρό Άζωτο.

Η διαδικασία της καλλιέργειας κυττάρων ξεκινά με την απόψυξη των κυττάρων από το υγρό άζωτο (-196°C), διαδικασία η οποία θα πρέπει να επιτελείται όσο το δυνατόν γρηγορότερα. Τα ειδικά κρυοφιαλίδια (cryonials) από το υγρό άζωτο θερμαίνονται τρίβοντάς τα με τα χέρια και όταν το περιεχόμενό τους (κύτταρα και ειδικό διάλυμα ψύξης) ξεπαγώσει, μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου falcon (όγκου 15ml), το οποίο περιέχει ήδη 2 ml θρεπτικού υλικού και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 1440 στροφές σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα (που περιέχει τα κύτταρα) επαναδιαλυτοποιείται σε 1 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρεται σε ειδικό δοχείο καλλιέργειας (φλάσκα T75) που περιέχει 20 ml θρεπτικό υλικό. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον ειδικό επωαστικό κλίβανο. Την επόμενη μέρα, το ειδικό δοχείο καλλιέργειας παρατηρείται σε ανάστροφο μικροσκόπιο, ώστε να επιβεβαιωθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων (πριν την παρατήρηση στο ανάστροφο μικροσκόπιο, η τράπεζα του μικροσκοπίου στην οποία θα τοποθετηθεί το δοχείο καλλιέργειας καθαρίζονται με διάλυμα αιθανόλης 70% για την τοπική αποστείρωση). Την επόμενη ημέρα, ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό για την πλήρη απομάκρυνση του DMSO που εμποδίζει τη σωστή ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται ανά δύο ημέρες και σε κάθε ανανέωση ακολουθεί προσθήκη του αντιβιοτικού G418 (200 µg/mL) για την επιλογή των κλώνων που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και μας ενδιαφέρει να επιβιώσουν.

Στο τέλος, μέσα στο θάλαμο νηματικής πραγματοποιείται μια αλλαγή θρεπτικού υλικού, με σκοπό να απομακρυνθούν τυχόν νεκρά κύτταρα.

3.4.3 Διαμοιρασμός Κυττάρων (split) – Ανακαλλιέργεια.

Τα κύτταρα καθώς ξεκινούν τις μιτωτικές διαιρέσεις τους, καλύπτουν προοδευτικά όλη την επιφάνεια του ειδικού δοχείου καλλιέργειας, δημιουργώντας ένα ταπήτιο. Προοδευτικά, έρχονται σε

στενή επαφή μεταξύ τους με αποτέλεσμα τη διακοπή της ανάπτυξής τους, ένα φαινόμενο που ονομάζεται αναστολή εξ επαφής. Όταν η πληρότητα του ταπητίου τους φθάσει περίπου στο 80% (80% confluency), για την αποφυγή δημιουργίας του φαινομένου αναστολής εξ επαφής και την περαιτέρω συνέχιση της καλλιέργειας, τα κύτταρα θα πρέπει να αποκολληθούν και να διαμοιραστούν σε περισσότερα δοχεία καλλιέργειας (split). Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι η εξής: Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από το δοχείο καλλιέργειας και πραγματοποιείται ένα ξέπλυμα του δοχείου με 3 ml PBS. Στη συνέχεια προστίθενται 2ml θρυψίνης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ελάχιστη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών που προκαλούν προσκόλληση των κυττάρων στον πάτο του τρυβλίου/ φλάσκας και να αποκολληθούν τα κύτταρα ώστε να πραγματοποιηθεί η αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο. Τα δοχεία καλλιέργειας μεταφέρονται στον επωαστικό κλίβανο για 5 περίπου λεπτά με σκοπό να δράσει η θρυψίνη. Μετά τα πέντε περίπου λεπτά, και αφού τα κύτταρα αποκολληθούν από το ταπήτιο, δημιουργώντας ένα θολό διάλυμα, στο θάλαμο νηματικής ροής, προστίθεται τριπλάσιος όγκος θρεπτικού (6ml), ούτως ώστε ο ορός (FBS) να απενεργοποιήσει την πρωτεολυτική της δραστηριότητα της θρυψίνης. Στη συνέχεια, αφού επιβεβαιώσουμε μέσω μικροσκοπίας ότι τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί, το μείγμα κυττάρων-θρεπτικού-θρυψίνης πραγματοποιείται αναρρόφηση του διαλύματος με τη βοήθεια πιπέτας και το εναίωρημα συλλέγεται σε νέο σωληνάκι τύπου Falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1440 στροφές/λεπτό, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό υλικό και ύστερα από ανάδευση διαχωρίζεται σε νέα τρυβλία με επιπλέον τοποθέτηση θρεπτικού υλικού έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή αραιώση σε κάθε τρυβλίο.

Τα δοχεία καλλιέργειας, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για την περαιτέρω διατήρηση της καλλιέργειας. Η καθεμία ανακαλλιέργεια αναφέρεται και ως passage.

3.4.4 Εξωγενής Χορήγηση παραγόντων (DA, carbidopa, STS).

Σε καλλιέργεια κυττάρων CHO, CHO/ DDC, CHO/ Alt- DDC και CHO/ DDC- 3 συγκέντρωσης 2×10^5 κύτταρα/ mL χορηγήθηκαν 25 και 75 μ M DA για 24 ώρες.

Σε καλλιέργεια κυττάρων CHO, CHO/ DDC, CHO/ Alt- DDC και CHO/ DDC- 3 συγκέντρωσης 2×10^5 κύτταρα/ mL χορηγήθηκαν 20 και 100 μ M carbidopa για 24 ώρες.

Σε καλλιέργεια κυττάρων CHO, CHO/ DDC, CHO/ Alt- DDC και CHO/ DDC- 3 συγκέντρωσης 2×10^5 κύτταρα/ mL χορηγήθηκαν 100 και 200 nM STS για 24 ώρες.

Μετά την έκθεσή τους στους παραπάνω παράγοντες, τα κύτταρα λύθηκαν, απομονώθηκε η πρωτεΐνη τους και υποβλήθηκαν σε τεχνική του ανοσοεντοπισμού με ανάλυση κατά Western.

3.4.5 Κατάψυξη και Φύλαξη Κυττάρων στους -80 °C στο Υγρό Άζωτο.

Κατά την πορεία της ανακαλλιέργειας, είναι δυνατό κάποιο ή κάποια από τα δοχεία καλλιέργειας, να μην είναι απαραίτητα για την χρήση τους στην πειραματική διαδικασία. Τα δοχεία αυτά, φυλάσσονται στο υγρό άζωτο, για μελλοντική χρήση. Τα δοχεία καλλιέργειας τα οποία προορίζονται για τη φύλαξη στο υγρό άζωτο, υφίστανται τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ωστόσο, η τελική επαναιώρηση των κύτταρων μετά τη φυγοκέντρωση, πραγματοποιείται σε ειδικό διάλυμα ψύξης. Τα κύτταρα αποκολλώνται από το τρυβλίο, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη διαδικασία, με μόνη διαφορά ότι η τελική επαναιώρηση των κυττάρων πραγματοποιείται σε διάλυμα ψύξης. Το διάλυμα ψύξης των κυττάρων αποτελείται από 10% DMSO σε διάλυμα του θρεπτικού υλικού και η προσθήκη του γίνεται πολύ γρήγορα. Το εναιώρημα κυττάρων μοιράζεται στα ειδικά κρυοφιαλίδια τα οποία μεταφέρονται στους -80 °C για μία ημέρα ή σε υγρό άζωτο για μεγαλύτερη διάρκεια διατήρησης των κλώνων (-196 °C).

Κατά την κρυοσυντήρηση επιδιώκεται η αποφυγή δημιουργίας σχηματισμού πάγου ενδοκυτταρικά, αφού οι κρύσταλλοι του πάγου, οι οποίοι καταλαμβάνουν μεγαλύτερο όγκο από το νερό, είναι δυνατόν είτε να καταστρέψουν τις μεμβράνες των κυττάρων είτε λόγω της δέσμευσης μορίων νερού στον πάγο, να προκαλέσουν αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών, η οποία μπορεί να είναι καταστροφική για το κύτταρο. Κατά τη διάρκεια της ψύξης στο υγρό άζωτο, το νερό στερεοποιείται στην κρυσταλλική μορφή του πάγου. Το DMSO, είναι ένα διαπερατό κρυοπροστατευτικό (με υψηλή διαλυτότητα στο νερό σε χαμηλές θερμοκρασίες), το οποίο προκαλεί αναδιάταξη της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητάς της. Διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και αντικαθιστά το μεγαλύτερο μέρος του ενδοκυτταρίου νερού. Τα μόρια του DMSO, όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο νερό, αναστέλλουν το σχηματισμό των κρυστάλλων του πάγου και δημιουργούν την κατάσταση του υαλώδους πάγου (vitrification), όπου το νερό μπορεί να στερεοποιηθεί χωρίς την περαιτέρω επέκτασή του. Σε αυτό το διάλυμα τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.5 Ανοσοστύπωμα κατά Western (Western Blot).

Για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε δείγματα από ομογενοποιημένους ιστούς ή από κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιείται η τεχνική του ανοσοεντοπισμού με ανάλυση κατά Western. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, καθώς βασίζεται στην εξειδικευμένη αντίδραση

αντιγόνου-αντισώματος. Στη διαδικασία του ανοσοεντοπισμού, το αντιγόνο βρίσκεται ακινητοποιημένο σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη επάζεται με ειδικό αντίσωμα (μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό) έναντι του αντιγόνου, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος. Ακολουθεί η προσθήκη δεύτερου αντισώματος κι η επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με αυτό για διάστημα 1 ώρας. Η αντίδραση του δεύτερου αντισώματος περιλαμβάνει τη σύνδεση αυτού με το πρώτο. Πρέπει να αναφερθεί ότι το δεύτερο αντίσωμα φέρει προσδεμένο ένζυμο (υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση), το οποίο καταλύει μια αντίδραση, όπου παράγεται έγχρωμο προϊόν. Η δημιουργία συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος στη μεμβράνη πιστοποιείται με την ανίχνευση έγχρωμου προϊόντος. Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατό να ανιχνευθούν πρωτεΐνες που μπορεί να εκφράζονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο δείγμα.

3.5.1 Συλλογή κυττάρων- Απομόνωση πρωτεϊνών.

Για τη συλλογή των κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και ακολουθεί πλύση με PBS 1X. Προστίθεται κατάλληλος όγκος PBS 1X και με τη χρήση ειδικού εργαλείου cell scraper αποκολλώνται τα κύτταρα και συλλέγονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου erpendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4° C για 15 λεπτά. Το ίζημα συλλέγεται και είναι έτοιμο για λύση είτε για αποθήκευση στους -20° C για μελλοντική χρήση.

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται το διάλυμα λύσης: RIPA BUFFER του οποίου τα συστατικά αναλύονται παραπάνω. Ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος καθορίζεται ο όγκος του διαλύματος λύσης που θα τοποθετηθεί. Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται στους 4° C συνολικά για 30 λεπτά ενώ κάθε 5-10 λεπτά πραγματοποιείται έντονη ανάδευση Vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 13.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4° C για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο περιέχει τις πρωτεΐνες που έχουν διαλυθεί και παραλαμβάνεται. Το υπερκείμενο θα περιέχει διαλυμένες κυτταροπλασματικές, μεμβρανικές και πυρηνικές πρωτεΐνες. Το υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυμένες πρωτεΐνες σε κάθε περίπτωση αποθηκεύεται στους -20° C. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford.

3.5.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Πρωτεϊνών με τη Μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford, είναι μια χρωματομετρική πρωτεϊνική διαδικασία και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Στην συγκεκριμένη διαδικασία, η χρωστική ουσία Coomassie G-250 διαλύεται σε ένα όξινο διάλυμα, κάνοντας το να απορροφήσει στα

465nm (καφεκόκκινο χρώμα). Την στιγμή που η βαφή, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη, συνδεθεί με τα θετικά φορτισμένα μόρια της πρωτεΐνης, η απορρόφηση του διαλύματος φτάνει τα 595nm (μπλε χρώμα). Η τιμή της απορρόφησης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο διάλυμα. Η ανάπτυξη του χρώματος, αποδίδεται στην παρουσία ορισμένων αμινοξέων (αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη) στην πρωτεΐνη. Δυνάμεις Van der Waals δημιουργούνται μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας και της βαφής ενώ ηλεκτροστατικές δυνάμεις δημιουργούνται μεταξύ αμινομάδας και βαφής. Τα ελεύθερα αμινοξέα και γενικά πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους δεν παράγουν χρώμα όταν χρησιμοποιούμε τέτοια αντιδραστήρια βαφής.

Κατά τη διαδικασία το αντιδραστήριο Bradford αραιώνεται 1:5 στη δική μας περίπτωση και στη συνέχεια προστίθεται 1 μl πρωτεϊνικού δείγματος και 1 mL αντιδραστηρίου Bradford σε κάθε ειδική κυψελίδα φωτομέτρησης. Έπειτα από ανάδευση Vortex και μια σύντομη αναμονή, ακολουθεί φωτομέτρηση όπου προσδιορίζεται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 595nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης γίνεται μέσω σύγκρισης των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων με τις τιμές της πρότυπης καμπύλης που έχει σχεδιαστεί και ελεγχθεί στο εργαστήριο. Η πρότυπη καμπύλη έχει σχεδιαστεί με προσδιορισμό της απορρόφησης στα 595 nm μιας σειράς δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης (BSA) σε απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση προσδιορίζεται σε μg/μl. Σε περίπτωση που οι τιμές συγκέντρωσης που προσδιορίζονται είναι μεγαλύτερες από αυτές της καμπύλης, τα δείγματα φωτομετρούνται πάλι ύστερα από αραιώση. Η πραγματική συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται με πολλαπλασιασμό του αποτελέσματος με το συντελεστή αραιώσης. Σε περίπτωση που η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση είναι μικρότερη της καμπύλης ακολουθείται η μέθοδος Microbradford.

Η λογική της μεθόδου είναι ίδια με την μέθοδο Bradford με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μικρότερων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης σε μg/μL. Επίσης, η τοποθέτηση των υπό μέτρηση δειγμάτων γίνεται σε ειδικά πιάτα Greiner 96 Flat Transparent 96 θέσεων, ενώ κάθε δείγμα τοποθετείται σε δύο θέσεις και χρησιμοποιείται ο μέσος όρος της απορρόφησης για προσδιορισμό μεγαλύτερης ακρίβειας. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης BSA (Bovine Serum Albumin) από μια αρχική συγκέντρωση, BSA 1mg/mL σε H₂O. Η χρώση Bradford αραιώνεται 1:5 και σε κάθε θέση του πιάτου τοποθετούνται 2 μl του κάθε δείγματος και 198 μl μείγματος Bradford δύο φορές για κάθε δείγμα και κάθε συγκέντρωση της καμπύλης. Ύστερα μετράται η απορρόφηση στα 595 nm μετά από ανάδευση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.

3.5.3 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών με SDS- PAGE σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης.

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική, που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση τη μοριακή τους μάζα. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων εκτελείται παρουσία του απορρυπαντικού SDS. Το SDS είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο αφενός αποδιατάσσει τις δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών (εκτός από αυτές που δημιουργούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς) κι αφετέρου προσδίδει αρνητικό φορτίο στα πρωτεϊνικά μόρια, ανάλογο της μάζας τους. Απόρροια αυτού είναι πως η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνικών μορίων μπορεί να αποτελεί συνάρτηση μόνο της μοριακής τους μάζας. Στα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (10 mM Tris-βάση, 10 % (κ.ο) γλυκερόλη, 2 % (κ.β) SDS, 5 % (κ.ο) β-μερκαπταιθανόλη, 0,002 % χρωστική Bromophenol blue). Τα δείγματα θερμαίνονται στους 100°C για 10 λεπτά. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και μείγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών μαζών, προκειμένου να εκτιμηθεί η μοριακή μάζα των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση επιτελείται στη συσκευή Mini protean II και III της BIO-RAD (Laemmli 1970) και το πήκτωμα διαχωρισμού (0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (κ.β.) SDS, 0,1 % (κ.β.) APS, 0,04 % (κ.ο.) Temed) έχει διαστάσεις 85 x 55 x 0,75 mm. Τέλος, στη συσκευή συμπληρώνεται το πήκτωμα συμπύκνωσης (βλ. 0,125 M Tris- HCl, pH 6,8, 0,1 % (κ.β.) SDS, 0,1 % (κ.β.) APS, 0,1 % (κ.ο.) Temed) και η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε συνθήκες σταθερής τάσης 150 V σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,192 M γλυκίνη , 0,1 % (κ.β.) SDS).

Η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο εκχύλισμα του ιστού αλλά και των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκε σε αποδιατακτικές συνθήκες κατά Laemmli. Τα δείγματα των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκαν περιείχαν επιπλέον H₂O και Laemmli διάλυμα Φόρτωσης (Sample Buffer). Το διάλυμα αυτό περιέχει μερκαπτοαιθανόλη για την αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Επίσης, περιέχει SDS που προσφέρει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες, γλυκερόλη για την σωστή τοποθέτηση των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις. Τέλος, περιέχει και κυανούν της βρωμοφαινόλης τόσο για τη σωστή τοποθέτηση των δειγμάτων όσο και για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Η ύπαρξη του ισχυρού απορρυπαντικού σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για πέντε λεπτά έχει ως αποτέλεσμα να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές ανά λεπτό. Σε κάθε

πήκτωμα φορτώνονται 5 μ L του μάρτυρα μεγεθών πρωτεϊνών Page Ruler Prest Protein Ladder και ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση τους. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πήκτες με δύο στρώσεις (stacking & separating gel) για την άριστη ανάλυση των πρωτεϊνών. Καθώς τα δείγματα μετακινούνται, περνούν από την πρώτη στρώση η οποία αποτελείται από χαμηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης 5% (w/v), χαμηλότερο pH και μικρότερο ιοντικό περιεχόμενο. Η σύσταση αυτή, επιτρέπει στις πρωτεΐνες να δομήσουν μία συμπυκνωμένη ζώνη και να εισέλθουν ταυτόχρονα στη δεύτερη στρώση διαχωρισμού. Η δεύτερη στρώση μπορεί να έχει περιεκτικότητα πολυακρυλαμίδης 8%, 12% και 15% (w/v), αναλόγως του είδους της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 120 V σε θερμοκρασία δωματίου και παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος τρεξίματος πρωτεϊνών (Running Buffer 1x). Η μετακίνηση των επεξεργασμένων πρωτεϊνών που έχουν αποκτήσει αρνητικό φορτίο και έχουν αποδιαταχθεί πραγματοποιείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο της συσκευής μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί μέχρι να ολοκληρωθεί η κατανομή των πρωτεϊνών σε όλο το μήκος του πήκτωματος και οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους μετακινούνται πιο γρήγορα σε σχέση με τις μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες.

3.5.4 Ανάλυση Πρωτεϊνών με Ανοσοστύπωση κατά Western (Western Blot).

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με χρήση ειδικής συσκευής μεταφοράς. Στην περίπτωση που το ενδιαφέρον μας εστίαζε στον εντοπισμό της DDC και των ισομορφών της, χρησιμοποιήθηκε συσκευή ημί-ξηρης μεταφοράς της BIO-RAD. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε μόνο σε αυτή την περίπτωση σε σταθερή τάση 20 V για 60 λεπτά. Η κατασκευή της κασέτας που θα τοποθετηθεί στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς περιλαμβάνει τοποθέτηση υλικών που έχουν διαβραχεί πρώτα με το διάλυμα μεταφοράς, με την παρακάτω σειρά : σφουγγάρι, 2 χαρτιά Whatman 7x9 cm, πήκτωμα, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 7x9 cm, 2 χαρτιά Whatman 7x9 cm, σφουγγάρι. Η προετοιμασία γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθούν φυσαλίδες αέρα που θα εμπόδιζαν τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Η κασέτα σφραγίζεται και τοποθετείται ώστε η μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων (λόγω του SDS) πρωτεϊνών να γίνει από τον αρνητικό στο θετικό πόλο με τη δέσμευση τους στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Έπειτα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν δεσμευτεί οι πρωτεΐνες υφίσταται χρώση Ponceau, η οποία δεσμεύεται σε όλες τις πρωτεΐνες και διαπιστώνεται εάν η μεταφορά είναι πετυχημένη. Η μεμβράνη, ξεπλένεται με απιονισμένο νερό ώσπου να απομακρυνθεί η χρωστική. Ακολουθεί η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα

σκόνης γάλατος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά 5% (w/v) σε διάλυμα πλύσεων ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (TNT), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, σε κάθε μεμβράνη τοποθετείται πρωτογενές αντίσωμα έναντι της επιθυμητής πρωτεΐνης, το οποίο έχει διαλυθεί σε διαφορετικές αραιώσεις ανάλογα με το είδος του, όπως φαίνεται στον πίνακα, είτε σε σκόνη γάλατος-TNT 1x 5% (w/v) είτε σε BSA-TNT 1x 5% (w/v). Η έκθεση της μεμβράνης στο αντίσωμα διαρκεί 16 ώρες στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις φορές για 10 λεπτά με TNT-1x, υπό ήπια ανάδευση για την απομάκρυνση του αντισώματος από τις μη ειδικές θέσεις. Στη συνέχεια, επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1,5 ώρα, υπό ήπια ανάδευση με δευτερογενές αντίσωμα, που είναι συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, και παρασκευάζεται σε αραιώση 1:10.000 σε σκόνη γάλατος 5% σε TNT-1x (w/v) ή σε BSA σε TNT-1x 5% (w/v). Ακολουθούν, τρεις δεκάλεπτες πλύσεις με TNT-1x, υπό ήπια ανάδευση. Η εμφάνιση των ζωνών γίνεται αρχικά μέσω επώασης σε διάλυμα ανάπτυξης και στη συνέχεια μέσω προσθήκης διαλύματος χρωματικής αντίδρασης. Η αντίδραση σταματά με τη μεταφορά νιτροκυτταρίνης σε απεσταγμένο νερό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

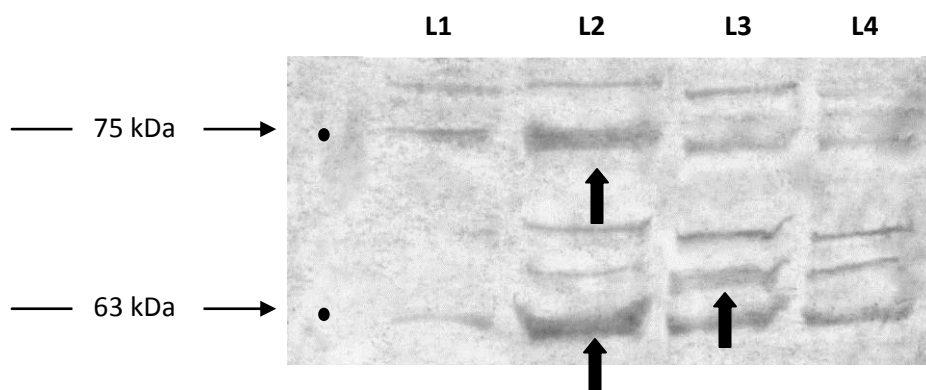
4.1 Μελέτη της Επίδρασης της DDC και των Ισομορφών της στην Έκφραση, στη Δημιουργία Υψηλομοριακών APP Συμπλόκων και στην Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πεπτίδιο Αβ είναι προϊόν της πρωτεολυτικής επεξεργασίας της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP), μιας τύπου I διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης. Η πρωτεόλυση πραγματοποιείται μέσω μιας διαδοχικής δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων που ονομάζονται εκκριτάσες (α-, β- και γ- εκκριτάση). Η πρωτεόλυση ξεκινά με τη δράση είτε της α- είτε της β- εκκριτάσης και ακολουθείται από τη δράση της γ- εκκριτάσης. Όταν μόρια της APP επεξεργάζονται από την α- εκκριτάση εντός της περιοχής του Αβ πεπτιδίου, τότε αποκλείεται η παραγωγή του Αβ. Όταν η επεξεργασία γίνεται από την β- και τη γ- εκκριτάση, παράγεται ένα πεπτίδιο του αμυλοειδούς, μήκους 17- 43 αμινοξέων. Το πεπτίδιο Αβ40 είναι το πιο άφθονο, το Αβ42 είναι αυτό το οποίο έχει σχετιστεί με τη AD. Επίσης, η πρωτεολυτική επεξεργασία από τις α- και β- εκκριτάση παράγει διαλυτές μορφές APP, οι οποίες ονομάζονται sAPPα και sAPPβ, αντίστοιχα. Οι διαλυτές αυτές μορφές εντοπίζονται και στο ανθρώπινο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και έχει προταθεί ότι μπορεί να αποτελούν δυνητικά νέους βιοδείκτες της AD [45]. Ενδιαφέρον έχει δείξει το γεγονός ότι η κυτοπλασματική περιοχή της πλήρους μήκους APP εντοπίζεται σε διαλυτή μορφή (sAPPf) και μπορεί να σχηματίζει ετερομερή [45], τα οποία έχουν μοριακή μάζα από 48 kDa έως 130 kDa. Όπως προ-αναφέρθηκε, η εμπλοκή της DA στην παθοφυσιολογία της νόσου έχει διαπιστωθεί από πολλές μελέτες. Γνωρίζοντας ότι η DDC είναι το βιοσυνθετικό ένα ένζυμο που οδηγεί στην παραγωγή της DA (μέσω αποκαρβοξυλίωσης της L- DOPA), κρίθηκε αναγκαίο στην παρούσα μελέτη να διερευνηθεί η επίδραση της DDC, όσο και των ισομορφών αυτής στη πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

Μελέτες έχουν δείξει το σχηματισμό των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών έδειξαν πως υπάρχει μία αλληλεπίδραση μεταξύ των μορφών της sAPP στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν ετερομερή σύμπλοκα. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στις υδρόφοβες ή/ και ιονικές ιδιότητες της APP [45]. Παρεμφερή σύμπλοκα, παρατηρούνται και στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που περιγράφονται παρακάτω.

4.1.1 Μελέτη της Επίδρασης της DDC και των Ισομορφών της στην Αμυλοειδογενή Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην κυτταρική σειρά CHO (Chinese Hamster Ovary cells). Οι παραχθείσες επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, έχουν αναφερθεί αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» και εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις συντετμημένες μορφές της. Ο εντοπισμός των πρωτεολυτικών θραυσμάτων που εμπεριέχουν τον επίτοπο του Αβ, πραγματοποιήθηκε μέσω ανοσοοτυπώματος κατά Western με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν παραχθεί στο εργαστήριο της επιβλέπουσας. Δείγματα ομογενοποιημένων κυττάρων αναλύθηκαν σε SDS- PAGE. Η οπτικοποίηση των παραχθέντων θραυσμάτων έγινε με τη μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης, που περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι».



Εικόνα 4.1.1: Μελέτη της επίδρασης της DDC και των ισομορφών της στην αμυλοειδογενή πρωτεολυτική επεξεργασία της APP:

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές.

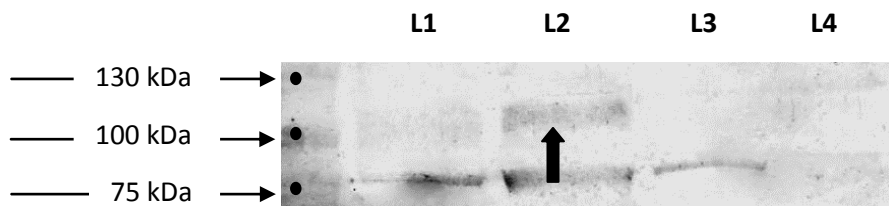
L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/ Alt- DDC; L4: CHO/ DDC- 3.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15%. Η ανίχνευση των πρωτεολυτικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

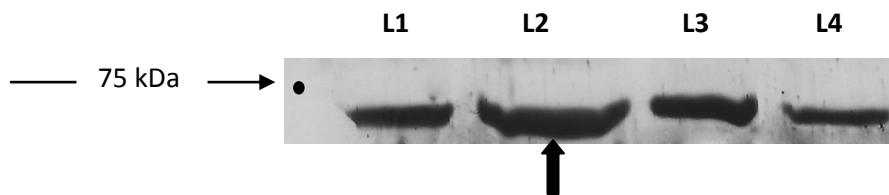
Στην εικόνα παρουσιάζεται το διαφορετικό προφίλ πρωτεολυτικής επεξεργασίας της APP, ανάλογα με την κυτταρική σειρά, στις περιοχές μεταξύ 75 έως και τα 63 kDa. Εντυπωσιακή είναι η παραγωγή πολλαπλών θραυσμάτων, καθώς και η αύξηση τους στην περιοχή των 75 kDa και των 63 kDa στην κυτταρική σειρά CHO/ DDC σε σχέση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα CHO. Η αύξηση αυτή παρατηρείται ακόμη και στις δύο συντετμημένες ισομορφές σε σχέση τα μη επιμολυσμένα κύτταρα, γεγονός που αποκαλύπτει τη διαφορετική επίδραση της DDC και των ισομορφών της στην πρωτεόλυση της APP.

4.1.2 Μελέτη της Επίδρασης της Έκφρασης της DDC και των Συντετμημένων Ισομορφών αυτής στην Έκφραση της Πλήρους μήκους APP και στην Καρβοξυτελική Πρωτεολυτική Επεξεργασία της.

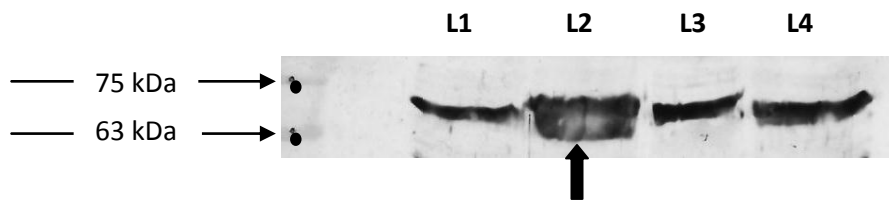
A.



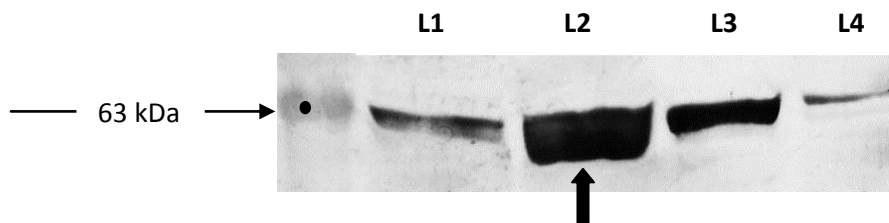
B.



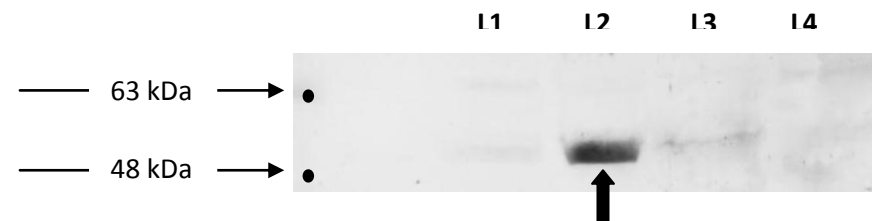
Γ.



Δ.



E.



Εικόνα 2: Μελέτη της επίδρασης της DDC και των ισομορφών της στην έκφραση της πλήρους μήκους APP και στην πρωτεολυτική επεξεργασία της:

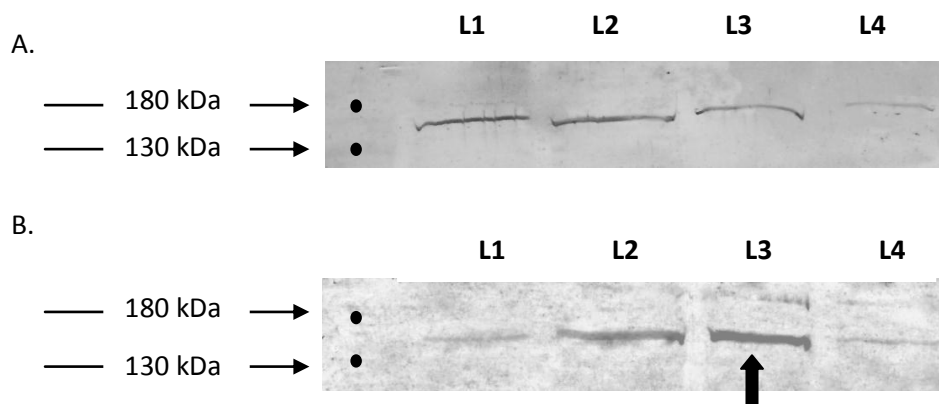
Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές.

L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/ Alt- DDC; L4: CHO/ DDC- 3.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15% και 8%. Η ανίχνευση των καρβοξυτελικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής C- terminal.

Στην εικόνα Α., παρουσιάζεται η πλήρους μήκους APP στην περιοχή ανάμεσα από τα 100 με 130 kDa, η οποία εμφανίζεται μόνο στην κυτταρική σειρά CHO/DDC. Αποκαλύπτεται η τεράστια αύξηση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP, παρουσία DDC. Στις εικόνες Β. έως Ε., είναι εμφανής ο ανοσοεντοπισμός των καρβοξυτελικών θραυσμάτων στις περιοχές από τα 75 έως και τα 48 kDa σε ένα εντυπωσιακά επαναλαμβανόμενο μοτίβο. Αποκαλύπτεται ξανά, η διαφορετική επίδραση της DDC και των συντεντημένων ισομορφών της, στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

4.1.3 Μελέτη της επίδρασης της DDC και των Ισομορφών της στη Δημιουργία Υψηλομοριακών Συμπλόκων της APP.



Εικόνα 3: Μελέτη της επίδρασης της DDC και των ισομορφών της στη δημιουργία υψηλομοριακών APP συμπλόκων:

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές.

L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/ Alt- DDC; L4: CHO/ DDC- 3.

Εικόνα Α: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 12%. Η ανίχνευση των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής C- terminal.

Εικόνα Β: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 12%. Η ανίχνευση των υψηλομοριακών συμπλόκων APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση αποκαλύπτεται η σημαντική εμπλοκή της DDC και των ισομορφών της στη δημιουργία ετερομερών συμπλόκων της APP. Και στις δύο εικόνες αποκαλύπτεται η δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων, τα οποία φαίνεται να εμπεριέχουν την πλήρους μήκους APP, αφού ο ανοσοεντοπισμός του επιτόπου του αμυλοειδούς και του καρβοξυτελικού επιτόπου, είναι εμφανής. Τα σύμπλοκα αυτά είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης της πλήρους μήκους APP με άλλες πρωτεΐνες ή με θραύσματα της ίδιας. Ο ρόλος της κάθε ισομορφής στην δημιουργία των συμπλόκων αυτών, είναι διαφορετικός.

Συνοψίζοντας:

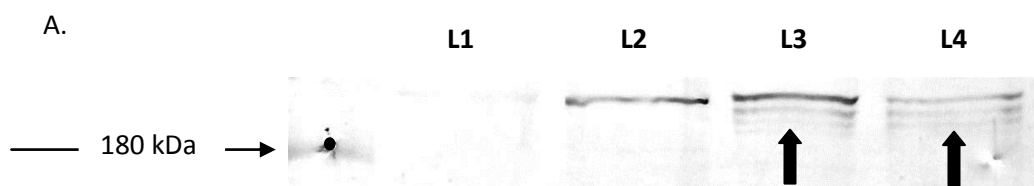
Η επίδραση της κυτταρικής σειράς CHO/ DDC, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα CHO, μεταξύ των 130- 180 kDa, την αύξηση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP στα ~115 kDa, καθώς και την εντυπωσιακή αύξηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας (αμυλοειδογενής και καρβοξυτελική) της APP στα 75, 63 και 48 kDa. Η επίδραση της κυτταρικής σειράς CHO/ Alt- DDC, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα CHO, μεταξύ των 130- 180 kDa, την απουσία της έκφρασης της πλήρους μήκους APP στα ~115 kDa, καθώς και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας (αμυλοειδογενής στα 63 kDa και καρβοξυτελική στα 75 kDa. Η επίδραση της κυτταρικής σειράς CHO/ DDC-3, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα CHO, μεταξύ των 130- 180 kDa, την απουσία της έκφρασης της πλήρους μήκους APP στα ~115 kDa, καθώς και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας (αμυλοειδογενής στα 63 kDa και καρβοξυτελική στα 75 και στα kDa.

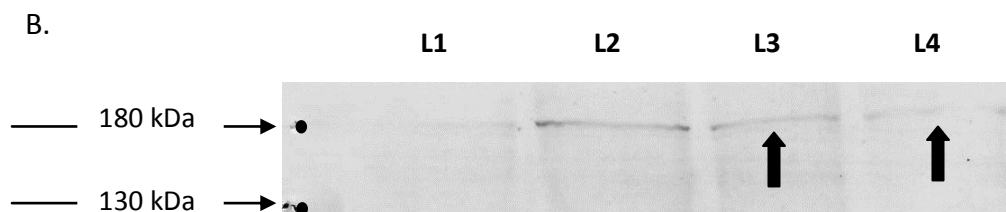
4.2 Μελέτη της Επίδρασης της DA στην Έκφραση και Πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις Κυτταρικές Σειρές που Εκφράζουν την Πλήρους Μήκους DDC και τις Εναλλακτικές Ισομορφές Αυτής.

Η ενεργότητα της DDC τροποποιείται από την εξωγενή χορήγηση DA μέσω δύο μονοπατιών. Το πρώτο περιλαμβάνει την άμεση πρόσληψη L- Dopa από το κύτταρο και τη μετατροπή της σε DA μέσω της δράσης της DDC, ενώ το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την έμμεση ενεργοποίηση της DDC μέσω του συστήματος μεταγωγής μηνυμάτων D1- υποδοχέας- κυκλικό AMP- πρωτεϊνική κινάση A [308].

Στην ενότητα αυτή, μελετήθηκε η εξωγενής χορήγηση DA στις κυτταρικές σειρές, για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της DDC στην πρωτεολυτική επεξεργασία αλλά και στην έκφραση της APP.

4.2.1 Μελέτη της Επίδρασης της DA (25 και 75 μ M) στη Δημιουργία Υψηλομοριακών APP Συμπλόκων, σε Κυτταρικές Σειρές CHO και CHO/ DDC.





Εικόνα 1: Μελέτη της επίδρασης της DA στη δημιουργία υψηλομοριακών διμερών APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/DDC:

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές.

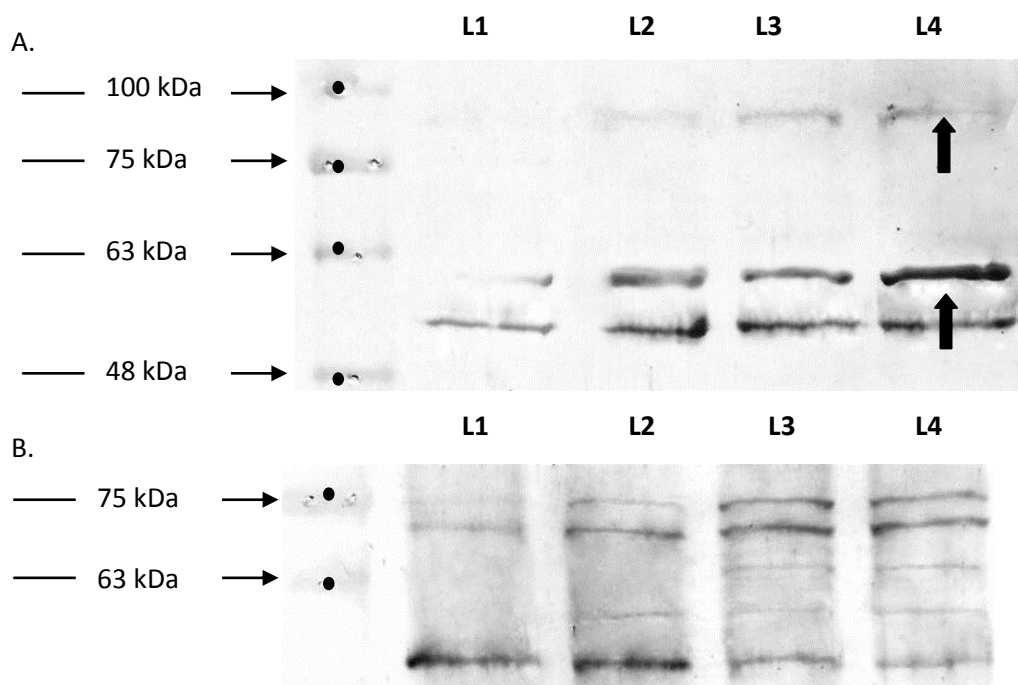
L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/ DDC+25 μM DA; L4: CHO/ DDC+75 μM DA.

Εικόνα A: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 8%. Η ανίχνευση των υψηλομοριακών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής C- terminal.

Εικόνα B: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15%. Η ανίχνευση των υψηλομοριακών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Παρουσιάζονται σύμπλοκα της APP στην περιοχή πάνω από τα 180 kDa, οι οποίες δείχνουν τη διαφορετική επίδραση της DDC, παρουσία DA. Εντυπωσιακές είναι οι έντονες ζώνες στη διαδρομή L3, όπου φορτώθηκε πρωτεΐνη κυττάρων CHO/ DDC, τα οποία είχαν επωαστεί με 25 μM DA. Παρουσία DA, η δημιουργία συμπλόκων APP, μειώνεται σε σύγκριση με τα CHO/ DDC που δεν επωάστηκαν με DA, αλλά αυξάνεται σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα CHO.

4.2.2 Μελέτη της Επίδρασης της DA (25 και 75 μM) στην Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP, σε Κυτταρικές Σειρές CHO και CHO/ DDC.



Εικόνα 2: Μελέτη της επίδρασης της DA στην πρωτεόλυση της APP, στις κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC:

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/ DDC+25 μM DA; L4: CHO/ DDC+75 μM DA.

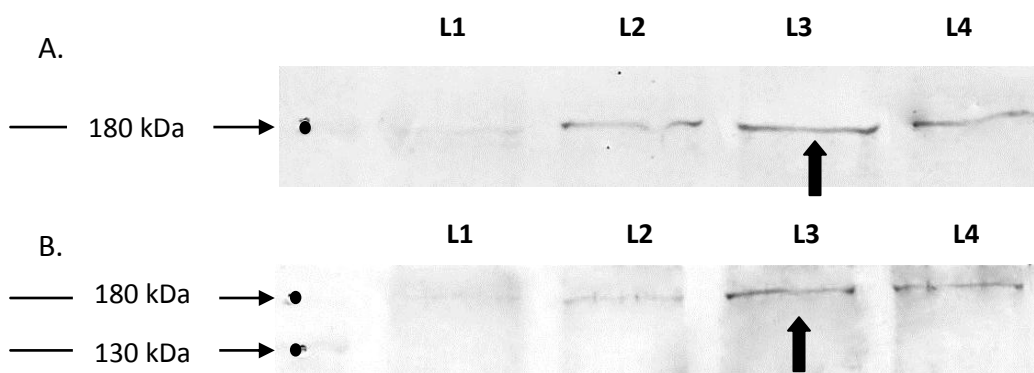
Εικόνα Α: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15%. Η ανίχνευση των καρβοξυτελικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής C- terminal.

Παρουσιάζεται η διαφορετική πρωτεόλυση που υφίσταται η APP, στην περιοχή ανάμεσα από 100 και 75 kDa, καθώς και ανάμεσα από τα 63 και 48 kDa, οι οποίες δείχνουν τη διαφορετική επίδραση της DDC, παρουσία DA. Εμφανείς είναι οι έντονες ζώνες στη διαδρομή L4, όπου φορτώθηκε πρωτεΐνη κυττάρων CHO/ DDC, τα οποία είχαν επωαστεί με 75 μM DA.

Εικόνα Β: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15%. Η ανίχνευση των πρωτεολυτικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Διακρίνεται εμφανώς ο μεγαλύτερος καταβολισμός της APP παρουσία DDC, καθώς και παρουσία DA και στις δύο συγκεντρώσεις.

4.2.3 Μελέτη της επίδρασης της DA (25 και 75 μM) στη δημιουργία υψηλομοριακών APP συμπλόκων, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC-3.



Εικόνα 3: Μελέτη της επίδρασης της DA στη δημιουργία υψηλομοριακών διμερών συμπλεγμάτων APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/DDC-3.

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

L1: CHO; L2: CHO/DDC-3; L3: CHO/ DDC-3+25 μM DA; L4: CHO/ DDC-3+75 μM DA.

Εικόνα Α: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 8% Η ανίχνευση των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

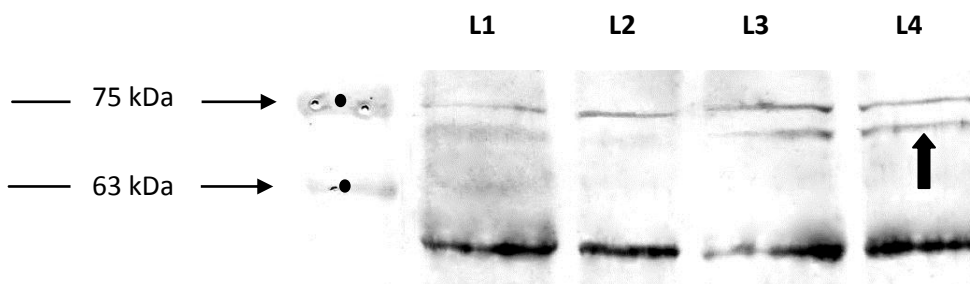
Εικόνα Β: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15% Η ανίχνευση των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Παρουσιάζονται υψηλομοριακά σύμπλοκα της APP στην περιοχή πάνω από τα 180 kDa, οι οποίες δείχνουν τη διαφορετική επίδραση της ισομορφής DDC-3, παρουσία DA. Φαίνεται πως η DA

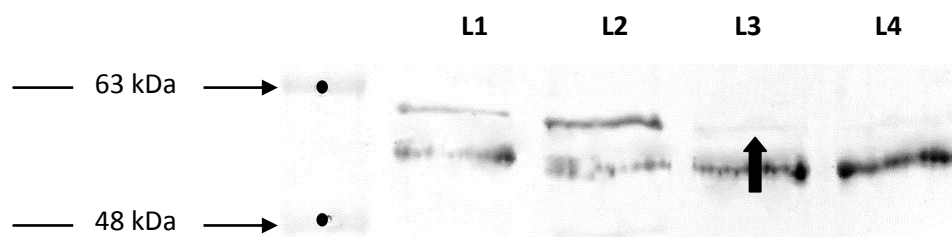
ευνοεί την δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων στην κυτταρική σειρά DDC-3, σε σχέση με τα κύτταρα που δεν επωάστηκαν με DA, αλλά και σε σχέση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα CHO.

4.2.4 Μελέτη της Επίδρασης της DA (25 και 75 μ M) στην Πρωτεολυτική επεξεργασία της APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC-3.

A.



B.



Εικόνα 4: Μελέτη της επίδρασης της DA στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP, στις κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC-3.

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

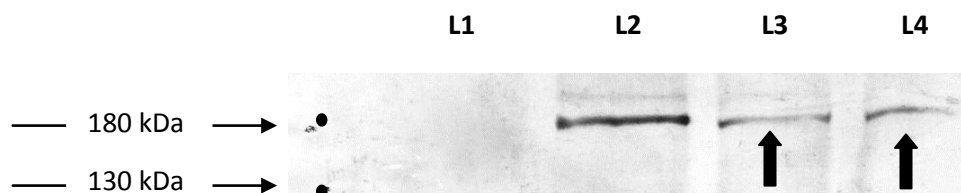
L1: CHO; L2: CHO/DDC-3; L3: CHO/ DDC-3+25 μ M DA; L4: CHO/ DDC-3+75 μ M DA.

Εικόνα A: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15% Η ανίχνευση των πρωτεολυτικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Εικόνα B: Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15% Η ανίχνευση των καρβοξυτελικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής C-terminal.

Παρουσιάζεται η διαφορετική πρωτεόλυση που υφίσταται η APP, στην περιοχή ανάμεσα από 48 και 75 kDa. Στην εικόνα A., φαίνεται πως η χορήγηση DA στην κυτταρική σειρά CHO/DDC-3 προωθεί τον καταβολισμό της APP στα 75 kDa. Αντιθέτως, στην εικόνα B., εντυπωσιακά είναι τα αποτελέσματα στην περιοχή ανάμεσα από τα 48 έως και τα 63 kDa, όπου εξαφανίζονται τα θραύσματα στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με DA.

4.2.5 Μελέτη της επίδρασης της DA (25 και 75 μ M) στη δημιουργία υψηλομοριακών APP συμπλόκων, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ Alt- DDC.



Εικόνα 5: Μελέτη της επίδρασης της DA στη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/Alt- DDC:

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

L1: CHO; L2: CHO/Alt- DDC; L3: CHO/ Alt- DDC+25 μ M DA; L4: CHO/ Alt- DDC+75 μ M DA.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 8%. Η ανίχνευση των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Στην εικόνα, παρουσιάζονται πιθανά σύμπλοκα της στην περιοχή πάνω από τα 180 kDa, οι οποίες δείχνουν τη διαφορετική επίδραση της Alt- DDC, παρουσία DA. Εντυπωσιακή επίδραση έχει η DA στην κυτταρική σειρά αυτή, καθώς φαίνεται να μειώνει τη δημιουργία συμπλόκων APP σε σχέση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με DA, αλλά φαίνεται να την αυξάνει σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα.

Συνοψίζοντας:

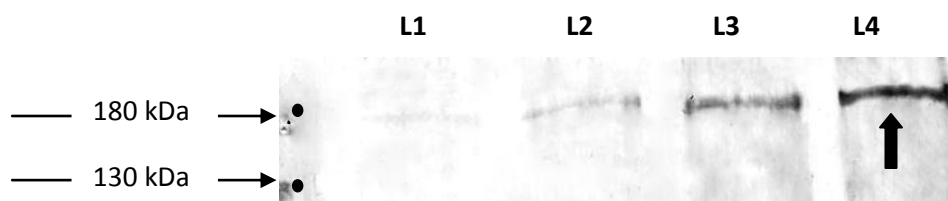
Στην κυτταρική σειρά CHO/ DDC, η χορήγηση της 25 μ M DA είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα πάνω από τα 180 kDa και την αύξηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας στα 63, 48 kDa. Στην κυτταρική σειρά CHO/ DDC, η χορήγηση της 75 μ M DA είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα πάνω από τα 180 kDa και την εντυπωσιακή τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας στα 75, 63 και 48 kDa. Στην κυτταρική σειρά CHO/ DDC-3 , η χορήγηση της 25 μ M DA είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα πάνω από τα 180 kDa και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας στα 63 kDa. Στην κυτταρική σειρά CHO/ DDC-3, η χορήγηση της 75 μ M DA είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα πάνω από τα 180 kDa και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας στα 63 kDa. Στην κυτταρική σειρά CHO/ Alt- DDC, η χορήγηση της 25 και 75 μ M DA είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών

συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα πάνω από τα 180 kDa, αλλά τη μείωση τους σε σχέση με τα DDC που δεν επώαστηκαν με DA.

4.3 Μελέτη της Επίδρασης της Carbidopa στην Έκφραση και στην Πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις Κυτταρικές Σειρές που Εκφράζουν την Πλήρους Μήκους DDC και τις Εναλλακτικές Ισομορφές Αυτής.

Η carbidopa (α - μεθυλ- Dopa- υδραζίνη) αποτελεί συναγωνιστικό αναστολέα της DDC, ο οποίος συνδέεται ομοιοπολικά με τη 5- φωσφορική πυριδοξάλη, που αποτελεί απαραίτητο συμπράγοντα του ενζύμου. Η carbidopa χορηγείται μαζί με την L- Dopa σε άτομα που πάσχουν από PD, ώστε να αναστέλλεται η περιφερική DDC, η οποία δεν μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Στην ενότητα αυτή, παρουσιάζεται η προσπάθεια διερεύνησης πιθανού συσχετισμού της DDC με την πρωτεόλυση της APP, με την εξωγενή χορήγηση του χημικού αναστολέα της DDC, carbidopa.

4.3.1 Μελέτη της επίδρασης της carbidopa (20 και 100 μ M) στη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC.



Εικόνα 1: Μελέτη της επίδρασης της carbidopa στη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/DDC:

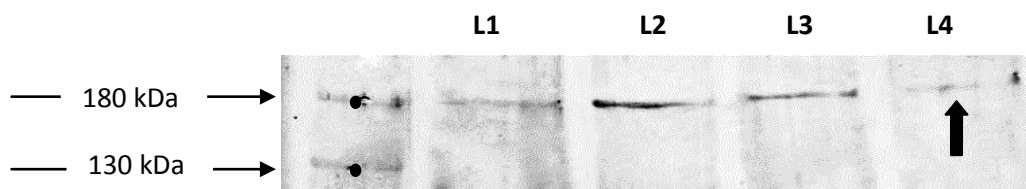
Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/DDC+20 μ M Carbidopa; L4: CHO/DDC+100 μ M Carbidopa.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 8%. Η ανίχνευση των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Στην εικόνα, παρουσιάζονται πιθανά σύμπλοκα της APP, στην περιοχή των 180 kDa, παρουσία carbidopa. Εντυπωσιακή επίδραση έχει η αναστολή της DDC, από την carbidopa συγκέντρωσης 100 μ M, καθώς φαίνεται να επάγει τη δημιουργία συμπλόκων APP σε σχέση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με carbidopa, αλλά και με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα. Η carbidopa επάγει το σχηματισμό APP συμπλόκων στην κυτταρική σειρά CHO/DDC.

4.3.2 Μελέτη της επίδρασης της carbidopa (20 και 100 μ M) στη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/ DDC-3.



Εικόνα 2: Μελέτη της επίδρασης της carbidopa στη δημιουργία υψηλομοριακών APP συμπλόκων, σε κυτταρικές σειρές CHO και CHO/DDC-3:

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

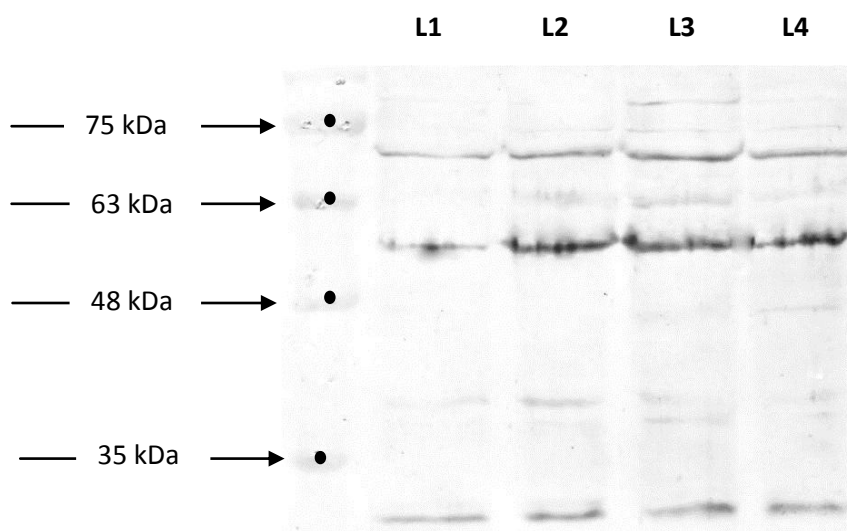
L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/DDC+20 μ M Carbidopa; L4: CHO/DDC+100 μ M Carbidopa.

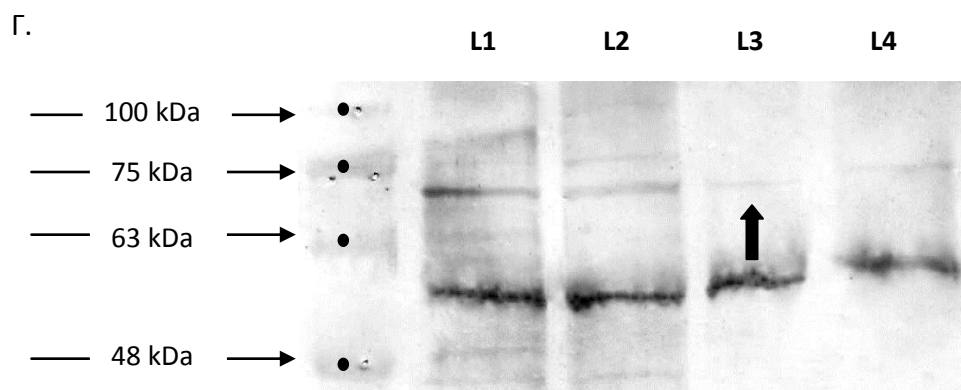
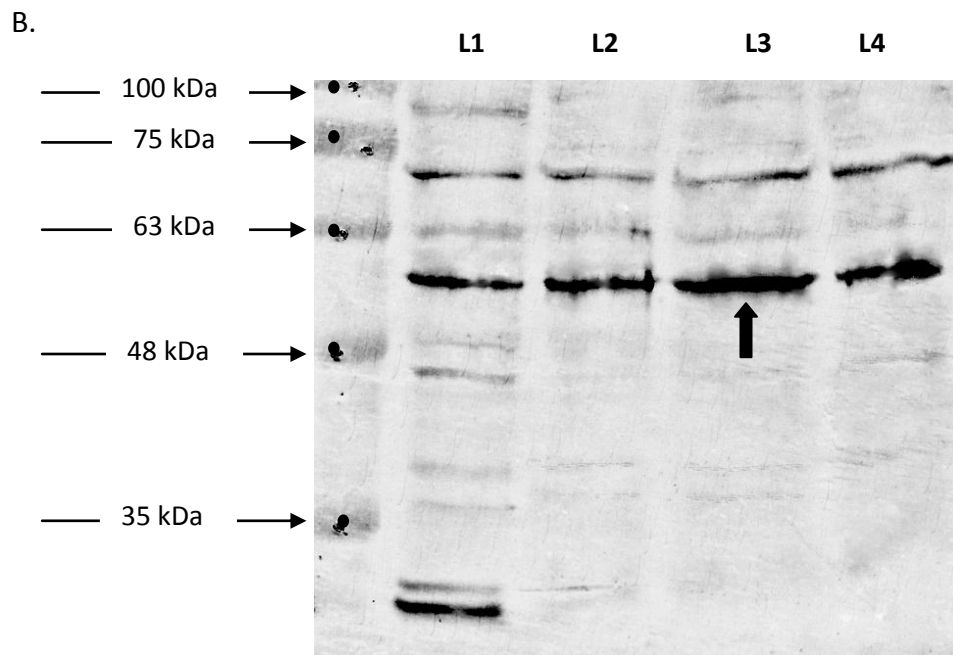
Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 8%. Η ανίχνευση των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Στην εικόνα, παρουσιάζονται πιθανά σύμπλοκα της APP, στην περιοχή των 180 kDa, παρουσία carbidopa. Εντυπωσιακή επίδραση έχει η αναστολή της DDC-3, από την carbidopa συγκέντρωσης 100 μ M, καθώς φαίνεται να καταστέλλει τη δημιουργία συμπλόκων της APP σε σχέση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με carbidopa, αλλά και με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα. Η carbidopa επάγει το σχηματισμό APP συμπλόκων στην κυτταρική σειρά CHO/DDC-3.

4.3.3 Μελέτη της επίδρασης της carbidopa (20 και 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP, σε κυτταρικές σειρές CHO, CHO/ DDC, CHO/ DDC-3 και CHO/ Alt- DDC.

A.





Εικόνα 3: Μελέτη της επίδρασης της carbidopa στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP, στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3 και CHO/Alt- DDC.

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

Εικόνα Α:

L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/DDC+20 μM Carbidopa; L4: CHO/DDC+100 μM Carbidopa.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15%. Η ανίχνευση των πρωτεολυτικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Εικόνα Β:

L1: CHO; L2: CHO/DDC-31; L3: CHO/DDC-3+ 20 μM Carbidopa; L4: CHO/DDC-3+100 μM Carbidopa.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 15%. Η ανίχνευση των πρωτεολυτικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Συμπεραίνουμε πως η carbidopa, επάγει την πρωτεολυτική διαδικασία της APP στην κυτταρική σειρά DDC-3 στα 63 kDa, ενώ σε χαμηλότερα μοριακά βάρη την αναστέλλει σε σχέση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα.

Εικόνα Γ:

L1: CHO; L2: CHO/DDC; L3: CHO/Alt- DDC+20 μ M Carbidopa; L4: CHO/Alt- DDC+100 μ M Carbidopa.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πήκτωμα πυκνότητας 15% Η ανίχνευση των πρωτεολυτικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Εδώ είναι εμφανής η αναστολή που επάγει η carbidopa στον καταβολισμό της APP στα 75 kDa, αναστέλλει κατά συνέπεια τη δημιουργία θραυσμάτων του αμυλοειδούς, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τον ενεργό ρόλο της Alt- DDC στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

Συνοψίζοντας:

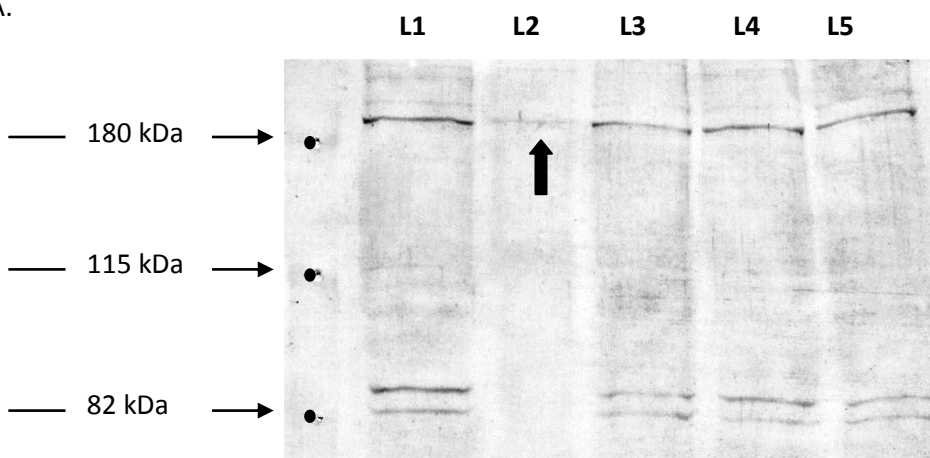
Στην κυτταρική σειρά CHO/ DDC, η χορήγηση της 20 μ M και 100 μ M carbidopa είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα πάνω από τα 180 kDa και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας από τα 75 έως και τα 35 kDa. Στις κυτταρικές σειρές CHO/ DDC-3 και CHO/ Alt- DDC, η χορήγηση της 20 μ M και 100 μ M carbidopa είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα πάνω από τα 180 kDa και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας από τα 75 έως και τα 35 kDa.

4.4 Μελέτη της Επίδρασης της Σταυροσπορίνης (STS) στην Έκφραση και στην Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP στις Κυτταρικές Σειρές που Εκφράζουν την Πλήρους Μήκους DDC και τις Εναλλακτικές Ισομορφές Αυτής.

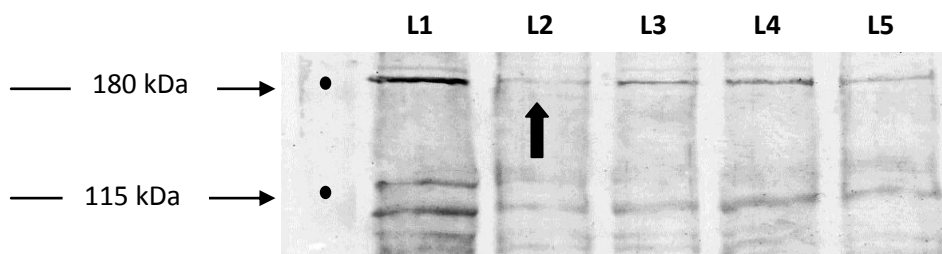
Η STS είναι ένα φυσικό προϊόν, το οποίο απομονώθηκε από το βακτήριο *Streptomyces staurosperus* το 1977, το οποίο έχει δείχθει πως διαθέτει αντιμυκητιακές και αντι- υπερτασικές βιολογικές λειτουργίες. Ως εκ τούτου, το αντιβιοτικό αυτό κέντρισε το ερευνητικό ενδιαφέρον, για τη χρήση του σε αντικαρκινικές θεραπείες. Η κύρια βιολογική ενεργότητα της STS είναι η αναστολή των πρωτεϊνικών κινάσων, εμποδίζοντας το ATP να συνδεθεί στην κινάση. Αυτό επιτυγχάνεται με την υψηλότερη συγγένεια της STS στην θέση δέσμευσης του ATP της κινάσης. Έρευνες έχουν δείξει, πως η STS έχει την ικανότητα να συρρικνώνει όγκους *in vivo* σε ποντίκια, χωρίς τις τοξικές παρενέργειες. Ως εκ τούτου προτάθηκε ως αντικαρκινικό φάρμακο με μεγάλη αποπτωτική ενεργότητα. Επίσης, έχει αναφερθεί όχι μόνο ως ένας προ- αποπτωτικός παράγοντας, αλλά ως ένας επαγωγέας διαφοροποίησης αρκετών κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος. Στην παρούσα ενότητα, έγινε μια προσπάθεια

μελέτης της ενεργότητας αυτής της STS στην έκφραση και στην πρωτεόλυση της APP, στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/ DDC, CHO/ DDC-3 και CHO/ Alt- DDC.

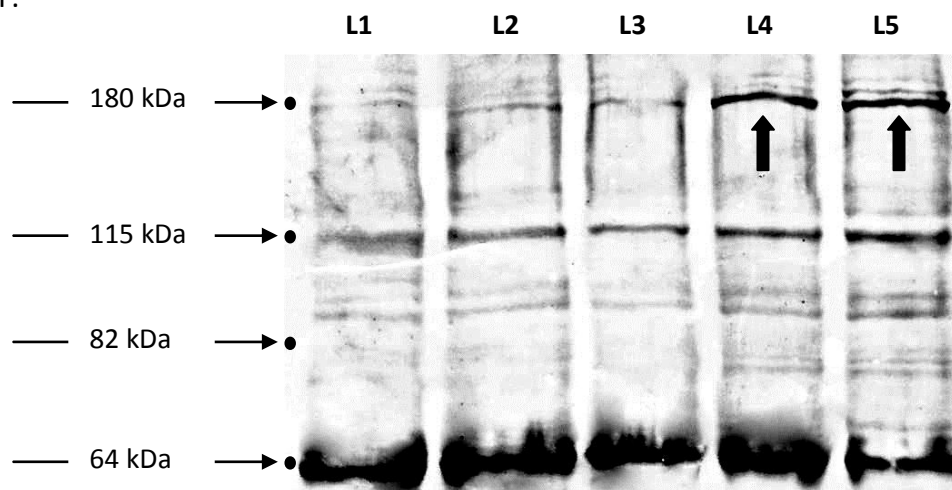
A.



B.



Γ.



Εικόνα: Μελέτη της επίδρασης της STS στην έκφραση, στην πρωτεόλυση της APP και στο σχηματισμό υψηλομοριακών APP συμπλόκων στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC.

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

Εικόνα Α+Β:

L1: CHO; L2: CHO+ 100 nM STS; L3: CHO/DDC+100 mM STS; L4: CHO/DDC-3+100 mM STS; L5: CHO/Alt-DDC+ 100 Mm STS.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 8%. Η ανίχνευση των αμυλοειδογενών άκρων της APP (στα 82 kDa), της πλήρους μήκους APP (στα 115 kDa περίπου) καθώς και των συμπλόκων της (στα 180 kDa), υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ.

Παρατηρείται πως παρουσία της DDC και των ισομορφών της, η πρωτεολυτική επεξεργασία της και η δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων, δεν επηρεάζεται, σε αντίθεση με την αναστολή της που παρατηρείται όταν απουσιάζει η DDC από τα κύτταρα, τα οποία επώαστηκαν με STS. Συνεπώς η STS, επάγει τον καταβολισμό της APP, τη δημιουργία υψηλομοριακών και αυξάνει έκφραση της πλήρους μήκους APP σε κύτταρα που εκφράζουν την DDC, την DDC-3 και την Alt- DDC. Ή διαφορετικά, η STS αναστέλλει την πρωτεόλυση, την έκφραση και τη δημιουργία ετερομερών της APP, ενώ η DDC φαίνεται να αναιρεί την αναστολή αυτή.

Εικόνα Γ:

L1: CHO; L2: CHO+ 100 nM STS; L3: CHO/DDC+100 mM STS; L4: CHO/DDC-3+100 mM STS; L5: CHO/Alt-DDC+ 100 Mm STS.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 8%. Η ανίχνευση των καρβοξυτελικών θραυσμάτων της APP, της πλήρους μήκους APP, καθώς και των συμπλόκων της υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής C- terminal.

Παρατηρείται, πως σε αυτή τη συγκέντρωση STS, επάγεται κατά πολύ περισσότερο η δημιουργία συμπλόκων στις κυτταρικές σειρές CHO/ DDC-3 και CHO/Alt- DDC, όπως επίσης αυξάνεται και η έκφραση της ολόκληρης APP.

Συνοψίζοντας:

Στην κυτταρική σειρά CHO/ DDC, η χορήγηση της 100 nM STS είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα στα 180 kDa, τη μείωση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP, στα 115 kDa, καθώς και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας στα 82 kDa. Η χορήγηση 200 nM STS στην ίδια κυτταρική σειρά, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα, στα 180 kDa, την αύξηση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP, στα 115 kDa και τέλος την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας από στα 82, 64 kDa. Στις κυτταρικές σειρές CHO/ DDC-3 και CHO/ Alt- DDC, η χορήγηση της 100 mM STS, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα που επώαστηκαν με STS στα 180 kDa, τη μείωση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP, στα 115 kDa, καθώς και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας στα 82 kDa.

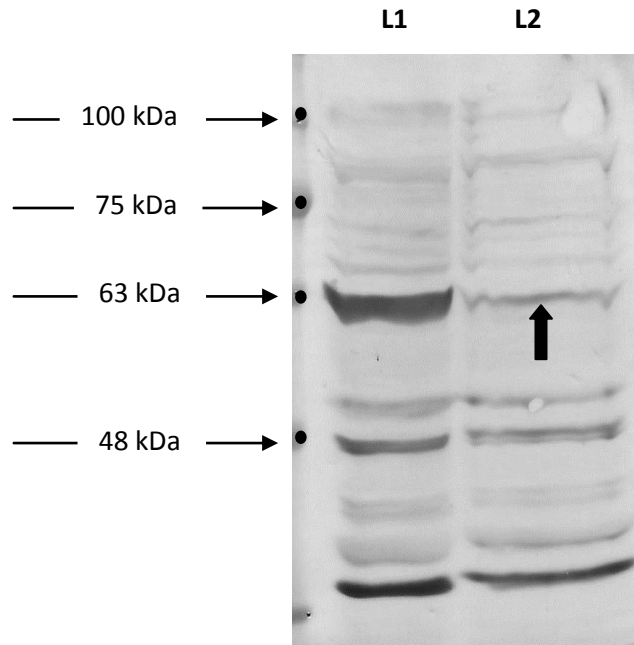
Στις κυτταρικές σειρές CHO/ DDC-3 και CHO/ Alt- DDC, η χορήγηση της 200 mM STS, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα που επώαστηκαν με STS στα 180 kDa, την αύξηση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP, στα 115 kDa, καθώς και την τροποποίηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας στα 82 και στα 64 kDa.

4.5 Μελέτη της Επίδρασης της Αννεξίνης V στην Έκφραση και στην Πρωτεολυτική Επεξεργασία της APP στις Κυτταρικές Σειρές που Εκφράζουν την Πλήρους Μήκους DDC και τις Εναλλακτικές Ισομορφές Αυτής.

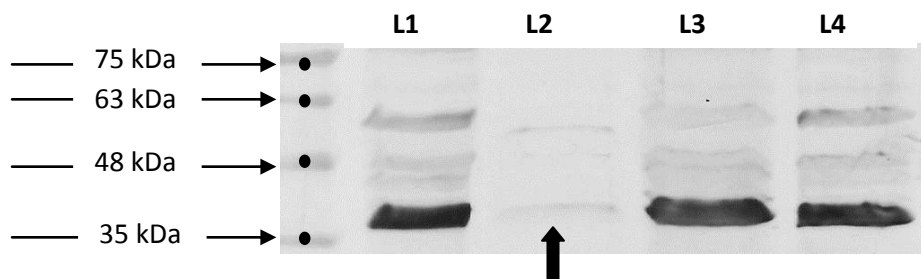
Η Αννεξίνη V ανήκει στις Αννεξίνες (Annexins), μια οικογένεια πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον 10 μέλη στα θηλαστικά. Οι πρωτεΐνες αυτές, διαθέτουν σημαντική δομική ομοιότητα και κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όπως πρόσδεση σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια. Ανακαλύφθηκε ως μία *in vitro* αντιθρομβωτική πρωτεΐνη, που προσδένεται ισχυρά σε φωσφολιπίδια και αιμοπετάλια. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η Αννεξίνη V αναστέλλει αρκετές αντιδράσεις που εξαρτώνται από φωσφολιπίδια, όπως την αποικοδόμηση λιπιδίων από τη φωσφολιπάση A₂. Αυτή η ιδιότητα φαίνεται να της προσδίδει αντι- φλεγμονώδη δράση, που οφείλεται στην ικανότητά της να αναστέλλει την έκκριση αραχιδονικού οξέος από τη φωσφολιπάση A₂. Επίσης, δε διαθέτει δράση φωσφολιπάσης ή πρωτεολυτική δράση, ωστόσο, αναστέλλει τη πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (Χαλατσά, Ι., Διδακτορική Διατριβή 2012).

Η Αννεξίνη V εμπλέκεται και στο μηχανισμό της απόπτωσης, κατά την οποία διαταράσσεται η φωσφολιπιδική ασυμμετρία της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται έκθεση αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων στην εξωτερική στιβάδα. Η Αννεξίνη V μπορεί να προσδεθεί σε αυτά τα φωσφολιπίδια και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται στον εντοπισμό αποπτωτικών κυττάρων. Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι η Αννεξίνη V που απομονώνεται από τον ανθρώπινο πλακούντα παρουσιάζει ανασταλτική δράση ως προς την ενζυμική ενεργότητα της DDC, και γι' αυτό το λόγο στην ενότητα αυτή έγινε προσπάθεια να ανασταλεί η ενεργότητα της DDC με τη βοήθεια του φυσικού ενδογενούς αναστολέα Αννεξίνη V, ώστε να αποδειχθεί ο καθοριστικός ρόλος του ενζύμου αυτού στην πρωτεόλυση της APP.

A.



B.



Εικόνα: Μελέτη της επίδρασης της Αννεξίνης V στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO/A5, CHO/DDC-A5, CHO/DDC και CHO/DDC-3.

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπο μελέτη κυτταρικές σειρές.

Εικόνα Α:

L1: CHO/ A5; L2: CHO/ A5- DDC

Εικόνα Β:

L1: CHO/ A5; L2: CHO/ A5- DDC; L3: CHO/DDC; L4: CHO/DDC-3

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 12%. Η ανίχνευση των καρβοξυτελικών θραυσμάτων της APP υλοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της περιοχής C- terminal.

Εντυπωσιακή είναι η μείωση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP, σε σχέση με την κυτταρική σειρά CHO/ A5- DDC, αλλά και η τεράστια καταστολή της πρωτεολυτικής επεξεργασία της APP, στα 75 έως και τα 35 kDa.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, περιγράφονται ως διαταραχές επιλεκτικής απώλεια νευρώνων και διακριτή συμμετοχή λειτουργικών συστημάτων που καθορίζουν τα κλινικά συμπτώματα. Εκτενείς μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν πως το κυριότερο φαινόμενο που παρατηρείται κατά τον νευροεκφυλισμό είναι η εμφάνιση πρωτεϊνών με τροποποιημένες τις φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες οδηγούν στην εναπόθεση τους στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Τα αδιάλυτα συσσωματώματα αμυλοειδογενών πρωτεϊνικών θραυσμάτων, έχουν ενοχοποιηθεί ως η κύρια αιτιολογία στην παθογένεση της AD και της PD. Παρ' όλα αυτά, η συγκεκριμένη άποψη την τελευταία δεκαετία έχει αρχίσει να αμφισβητείται. Οι σύγχρονες ερευνητικές προσεγγίσεις έχουν αρχίσει να επικεντρώνονται στη σημασία των μικρών νευροτοξικών ολιγομερών του Αβ στην παθογένεση της AD, της PD, της Creutzfeldt- Jakob και της Huntington. Αναφορικά, πολλές περιπτώσεις ασθενών, στους οποίους δεν έχει παρατηρηθεί κάποιο από τα τυπικά νευρολογικά συμπτώματα, έχουν εντοπιστεί άφθονες πλάκες του αμυλοειδούς στον εγκέφαλό τους. Επίσης, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για την AD, οι οποίες είχαν σαν απώτερο στόχο την απομάκρυνση των πλακών του αμυλοειδούς, απέτυχαν. Για τους λόγους αυτούς, υπάρχει προσπάθεια ανάπτυξης εναλλακτικών τρόπων θεραπείας, οι οποίες έχουν ως στόχο την αναστολή των νευροτοξικών ολιγομερών του αμυλοειδούς [309].

Πληθώρα ερευνητών έχει ασχοληθεί με τη βιολογία του ενζύμου DDC. Το ένζυμο αυτό ήταν το πρώτο που βρέθηκε να εμπλέκεται στο βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης κατεχολαμινών και το οποίο καταλύει το δεύτερο από τα τέσσερα συνολικά βήματα που περιλαμβάνει η μεταβολική οδός βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών. Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει την αποκαρβοξυλίωση της L- 3, 4 διυδροξυ- φαινυλ- αλανίνη σε ντοπαμίνη [109, 111, 186]. Γεγονότα εναλλακτικής συρραφής κατά την έκφραση της DDC, παράγουν το mRNA και τις πρωτεΐνες της DDC και των ισομορφών της. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ενώ έχουν βρεθεί πολλαπλές ισομορφές της DDC, τίποτα δεν είναι γνωστό για τη δράση των DDC-3 και Alt- DDC. Το ένζυμο αυτό έχει συσχετιστεί με την παθογένεση διαφόρων νεοπλασιών, καθώς και με την παθογένεση νευροεκφυλιστικών νόσων [112]. Επίσης, η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς APP, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, υφίσταται πρωτεόλυση από πολλαπλές ενζυμικές διαδικασίες και παράγει πληθώρα πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του πεπτιδίου Αβ, η εξωκυττάρια απόθεση του οποίου αποτελεί ένα από τα κύρια ιστοπαθολογικά ευρήματα της νόσου. Ανάλογα με τη δράση των διαφορετικών εκκριτασών, δημιουργούνται και αντίστοιχες πεπτιδικές μορφές, οι οποίες αποτελούν εν δυνάμει βιοδείκτες για τη νόσο AD [45]. Την τελευταία δεκαετία, συσσωρεύονται συνεχώς νέα πειραματικά δεδομένα, σε μοριακό και βιοχημικό

επίπεδο, όσο και σε επίπεδο σάρωσης του γονιδιώματος και μελέτη γονιδιακή έκφρασης, με στόχο την ταυτοποίηση κοινών γονιδίων και μοριακών μονοπατιών, στους μηχανισμούς που διέπουν την παθογένεση του νευροεκφυλισμού. Οι μέχρι σήμερα γνωστοί μοριακοί μηχανισμοί ασθενειών που οδηγούν στην εκδήλωση άλλων νευροεκφυλιστικών χαρακτηριστικών, όπως η άνοια με σωμάτια Lewy (DLB), υποστηρίζουν αλληλεπικάλυψη μοριακών μηχανισμών των AD και PD [299]. Η DLB είναι μια πρωτογενής νευροεκφυλιστική νόσος με παρεμφερή κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά τόσο της PD, όσο και της AD. Κοινός παρανομαστής των δύο νόσων θα μπορούσε να θεωρηθεί η DA, ένας ευρέως διανεμημένος νευροδιαβιβαστής του κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) και άλλων περιφερικών περιοχών. Στον εγκέφαλο, η DA εμπλέκεται σε διαδικασίες ελέγχου των κινήσεων, της γνώσης, των συναισθημάτων, της μνήμης, του μηχανισμού ανταμοιβής και της ρύθμισης της έκκρισης προλακτίνης από την υπόφυση. Πολλές ασθένειες έχουν σχέση με διαταραχές της έκκρισης και της πρόσληψης της DA όπως νευροψυχιατρικές διαταραχές, όπως διαταραχή υπερκινητικότητας έλλειψης προσοχής (ADHD), σύνδρομο Tourette (TS), σχιζοφρένεια, ψύχωση, κατάθλιψη κλπ. και με νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η PD, η HD και η πολλαπλή σκλήρυνση (MS). Η λειτουργική πολυπλοκότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων και η μεγάλη σημασία της DA στη λειτουργία του εγκεφάλου καθιστούν τα κύτταρα αυτά ιδιαίτερα ευαίσθητα στις εκφυλιστικές διαδικασίες. Το γεγονός αυτό, μπορεί να αποτελεί τη βάση της αιτιολογίας του επιλεκτικού εκφυλισμού τους, κατά τη γένεση των νευροεκφυλιστικών μηχανισμών. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ντοπαμινεργικών νευρώνων είναι το οξειδωτικό περιβάλλον το οποίο διατηρούν. Το χαρακτηριστικό αυτό έχει θεωρηθεί ως η κύρια βιοχημική αιτιολογία, σύμφωνα με την οποία τα κύτταρα αυτά είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στον επιλεκτικό εκφυλισμό. Τα κύτταρα εκφράζουν το βιοσυνθετικό μόριο της DA, μόριο το οποίο μπορεί να συμμετέχει στους παραπάνω παθογενετικούς μηχανισμούς. Η διερεύνηση του ρόλου της DDC, στο πλαίσιο της συμμετοχής της στους παθογενετικούς μηχανισμούς νευροεκφυλισμού, απέτέλεσε κύριο στόχο της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα της ερευνητικής εργασίας δείχνουν για πρώτη φορά την επίδραση της έκφρασης της DDC και των ισομορφών αυτής στο μεταβολισμό της APP. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε μοντέλο κυττάρων ντοπαμινεργικής λειτουργίας, όπως προαναφέρθηκε [222].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, παρουσιάζεται για πρώτη φορά η επίδραση της DDC και των ισομορφών της, με την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς. Έγινε διερεύνηση της έκφρασης, του μεταβολισμού, καθώς και της δημιουργίας υψηλομοριακών APP συμπλόκων, σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις ισομορφές αυτής (CHO, CHO/ DDC, CHO/ DDC-3, CHO/ Alt-DDC), με ή χωρίς εξωγενή χορήγηση παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν την λειτουργία ή την ενεργότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας παρουσιάζουν για πρώτη

φορά τη συσχέτιση της DDC και των συγκεκριμένων ισομορφών με το μεταβολισμό και την έκφραση της APP, ενισχύοντας το ενδιαφέρον για το ρόλο των ισομορφών αυτών στη διαλεύκανση του τρόπου ρύθμισης του ενζύμου DDC και του τρόπου με τον οποίο αλληλεπιδρά με την APP.

Οι ερευνητικές προσεγγίσεις επεκτάθηκαν και στη μελέτη της επίδρασης παραγόντων, που είναι γνωστό ότι επιδρούν στην DDC, όπως η DA και η carbidopa αλλά και παραγόντων που εμπλέκονται σε αποπτωτικούς μηχανισμούς όπως A5 και STS. Το κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιήσαμε είναι απαλλαγμένο παράγοντες που σχετίζονται με την παραγωγή και το μεταβολισμό των κατεχολαμινών που συναντώνται σε όλα τα νευρικού τύπου κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε την κυτταρική σειρά CHO-K1. Όπως έχειδειχθεί στη βιβλιογραφία, τα κύτταρα αυτά δε διαθέτουν ικανότητα αποκαρβοξυλίωσης της L-DOPA και για το λόγω αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα ντοπαμινεργικών νευρώνων [243] έπειτα από επιμόλυνση με τη DDC. Οι επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι κάτωθι: CHO/ DDC και οι ισομορφές της CHO/DDC-3 και CHO/ Alt-DDC. Οι ισομορφές αυτές έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο και ο ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί.

Βέβαια, η έλλειψη πειραματικών μοντέλων που προσομοιάζουν την ανθρώπινη κατάσταση δημιουργεί ελλείμματα στις ερευνητικές προσεγγίσεις. Το γεγονός αυτό αποτελεί τροχοπέδη για την έρευνα των νευροεκφυλιστικών νόσων και της νευρωνικής ανάπτυξης. Σύγχρονα ερευνητικά πρωτόκολλα της υπερέκφρασης της ανθρώπινης APP, δεν προσεγγίζουν με ακρίβεια την κατάσταση του ανθρώπου. Επιπλέον, η ανθρώπινης προέλευσης κυτταρικές σειρές αποτελούνται συνήθως από καρκινικά κύτταρα και τα περισσότερα εκ των οποίων στερούνται χαρακτηριστικά φυσιολογικών νευρώνων. Υπογραμμίζεται ότι ερευνητικές μελέτες με στόχο τη διερεύνηση της σταθερότητας της APP στους διάφορους κυτταρικούς τύπους έδειξαν διαφορεική πρωτεολυτική επεξεργασία ανάλογα με τους κυτταρικούς τύπους. Η πρωτεόλυση της APP έως την παραγωγή του Αβ, μπορεί να σχετίζεται με τη σταθερότητα της έκφρασής της APP [310]. Συμπερασματικά το πεπτίδιο Αβ δυνητικά μπορεί να παράγεται με διαφορετικό τρόπο σε διάφορους κυτταρικούς τύπους κυττάρων. Επιπλέον, οι διαφορές στα ποικίλα APP πεπτίδια ή οι μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται τα πεπτίδια αυτά, θα μπορούσαν πιθανώς να οφείλονται με την απουσία πρωτεολυτικής δραστηριότητας κατά το συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης ή στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Έχειδειχθεί ότι, κατά τη διάρκεια της νευρωνικής διαφοροποίησης, υπάρχουν στάδια στα οποία μπορεί να εκφράζεται η APP, αλλά να μην καταβολίζεται άρα να μην ανιχνεύονται θραύσματά της ή στάδια στα οποία η APP επεξεργάζεται μέσω του μη αμυλοειδογενούς μονοπατιού ή στάδια στα οποία η APP είναι υπόστρωμα πρωτεολυτικής επεξεργασίας από την β-/γ- εκκριτάση και οδηγεί στην παραγωγή μεγαλύτερων

αμυλοειδογενών πεπτιδίων, εν δυνάμει Αβ πεπτιδίων [311]. Ακόμη, ορισμένα επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν πως τα θραύσματα χαμηλού μοριακού βάρους μπορούν να ανιχνευτούν μόνο με αντισώματα έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής του μορίου της APP [310].

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πρότυπο της πρωτεόλυσης της APP, διαφέρει ανάλογα με την ισομορφή της DDC που εξέφραζε η κάθε υπο μελέτη κυτταρική σειρά. Τα μικρότερα πρωτεολυτικά θραύσματα που ανιχνεύονται, μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα ενδιάμεσο βήμα μεταξύ της πλήρους μήκους APP της παραγωγής του Αβ [312]. Ο ανοσοεντοπισμός σημαντικής ποσότητας θραύσματος της APP, που εμφανίζεται στα 75 kDa, σε κύτταρα που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC, μας αποκαλύπτει πως η DDC, σε σχέση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα CHO καθώς και με τις εναλλακτικές ισομορφές της, επάγει σε μεγαλύτερο βαθμό την πρωτεόλυση της APP. Ίδια παρατήρηση έγινε και σε εναλλακτικό θραύσμα μοριακής μάζας 63 kDa. Τα περισσότερα θραύσματα που δημιουργούνται είναι μία απόδειξη πως το ένζυμο αυτό παίζει ενεργό ρόλο στο μεταβολισμό της APP και ως εκ τούτου στη δημιουργία αμυλοειδογενών θραυσμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η DDC-3, μια ισομορφή που δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα φαίνεται να επηρεάζει τον αμυλοειδογενή μεταβολισμό της APP, δημιουργώντας τη βασική υπόθεση, ότι η τροποποίηση του μεταβολισμού της APP δεν οφείλεται πιθανώς στην ενζυμική ενεργότητα της DDC, αλλά στην πιθανή αλληλεπίδραση της DDC με την APP, όπως έχουν δείξει μη δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας. Εναλλακτικά, στην περίπτωση του καταβολισμού που παρατηρείται στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC, η τροποποίηση καταβολισμού της APP είναι εμφανώς εντονότερη σε σύγκριση με το προφίλ που δημιουργούν οι συντετμημένες ισομορφές DDC-3 και Alt-DDC, το οποίο είναι πιθανώς αποτέλεσμα ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου αλλά και πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης του με την APP. Η παρουσία του εξωνίου 3 προτείνεται πως έχει μεγάλη σημασία είτε στην αναγνώριση του υποστρώματος είτε στη δόμηση τριδιάστατης δομής για την πρόσδεση της L-DOPA ή της 5-υδροξυτρυπτοφάνης, καθώς η AADC442 δεν έχει την ικανότητα να καταλύει τη μετατροπή τους σε αντίθεση με την AADC48 [160]. Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί η δυνατότητα αλληλεπίδρασης της συγκεκριμένης ισομορφής με την APP. Η αλληλεπίδραση αυτή θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί πιθανόν με πειράματα ανοσοκατακρίμνησης, για την ερμηνεία του ρόλου του εξωνίου 3 της DDC όσον αφορά την αλληλεπίδραση του συγκεκριμένου σημείου του ενζύμου που κωδικοποιείται από το εξώνιο 3 με την APP.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ανάλογα με την ισομορφή που χρησιμοποιείται, τροποποιείται το ανιχνεύσιμο πρωτεολυτικό προφίλ της APP. Ακόμη και η συντετμημένη μορφή Alt-DDC που εκφράζεται κυρίως στο νεφρό, παρατηρείται τροποποίηση της

πρωτεολυτικής επεξεργασίας της APP. Στην περίπτωση της κυτταρικής σειρά που εκφράζουν Alt- DDC, τα θραύσματα της APP φαίνονται μειωμένα σε σχέση με τη DDC, αλλά όχι τόσο όσο στην περίπτωση της DDC-3. Το γεγονός αυτό ίσως να υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο του εξωνίου που απουσιάζει ή του πρόσθετου εναλλακτικού εξωνίου 10 για την ενεργότητα του ενζύμου αλλά και για την αλληλεπίδραση με την APP. Αν και στην περιοχή πάνω από τα 63 kDa παρατηρούνται πολλά παραγόμενα θραύσματα στη διαδρομή αυτή, δηλαδή αυξημένα επίπεδα αμυλοειδογενών θραυσμάτων, σε γενικές γραμμές ο καταβολισμός της APP σε κύτταρα επιμολυσμένα με cDNA της Alt- DDC, φαίνεται μειωμένος σε σχέση με τον καταβολισμό της APP από την DDC. Δεδομένου του γεγονότος ότι η κυτταρική τοπολογία της APP είναι διαμεμβρανική τύπου I, θα μπορούσε η επίδραση των ισομορφών της DDC να είναι στο διαλυτό ή στο μεμβρανο- σχετιζόμενο κλάσμα της APP. Βάσει των ανωτέρω, το σύνολο της πρωτεΐνης έχει σημασία στην πρωτεόλυση της APP, δίνοντας έμφαση στα εξώνια που μοιράζονται και οι τρεις ισομορφές.

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και στη συνέχεια όπου η ανίχνευση της πλήρους μήκους APP, καθώς και των θραυσμάτων της έγινε με χρήση αντισώματος anti- C- terminal. Η μεμβρανο- σχετιζόμενη APP (sAPPf) συνήθως ανιχνεύεται ως μια ομάδα πρωτεϊνών στα 110- 130 kDa, ενώ τα θραύσματα τα οποία προκύπτουν από την πρωτεόλυση των α ,- και β ,- εκκριτασών (sAPP α και sAPP β , αντίστοιχα), είναι περίπου ~5-10 kDa μικρότερα και ως εκ τούτου είναι λίγο δύσκολο να ξεχωρίσουν [45]. Ανάμεσα από τα 100 και τα 130 kDa εμφανίζονται πολλά θραύσματα της APP στην διαδρομή της DDC, τα οποία είναι σαφώς λιγότερα στα μη επιμολυσμένα κύτταρα και δεν εμφανίζεται καθόλου στις άλλες δύο ισομορφές. Το προφίλ αυτό επαναλαμβάνεται στις περιοχές 48 έως και 75 kDa, με τη διαφορά ότι στις ισομορφές Alt- DDC και DDC-3 παράγονται θραύσματα, ακόμη και στην περίπτωση του καταλυτικά ανενεργού ενζύμου της DDC-3. Τα καρβοξυτελικά θραύσματα που παρατηρούνται, θεωρείται ότι μπορεί να λειτουργήσουν και ως μεταγραφικοί παράγοντες.

Η ρύθμιση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP, έχει αποτελέσει στόχο αναρίθμητων ερευνών. Έχει δειχθεί πως mRNA, τα οποία κωδικοποιούν τις 3 κύριες ισομορφές της APP (APP695, APP751 και APP770), διανέμονται σε νευρικούς και μη νευρικούς ιστούς [313]. Οι ισομορφές αυτές συμμετέχουν σε πληθώρα αναπτυξιακών διαδικασιών του εγκεφάλου. Αδιευκρίνιστο παραμένει ωστόσο, εάν αυτές οι επιδράσεις οφείλονται στην πλήρους μήκους APP ή στις διαλυτές/ εκκρινόμενες μορφές της, όπως η sAPP α και sAPP β . Υπό μελέτη βρίσκεται η βιολογική δράση του Α β . Πολλές ενδογενείς λειτουργίες του Α β έχουν προταθεί, οι οποίες σχετίζονται με τη συναπτική ομοιόσταση [311]. Μικρές συγκεντρώσεις του Α β , ενδέχεται να έχουν προστατευτικές επιδράσεις στους νευρώνες και στις συνάψεις. Ακόμη και στην περίπτωση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP, ο ρόλος της DDC

και των ισομορφών της, φαίνεται να είναι καίριος [158, 311, 312]. Η APP και τα προϊόντα πρωτεόλυσής της, μπορεί να είναι σημαντικά τόσο κατά τη διάρκεια της νευρωνικής ανάπτυξης, όσο και στον ενήλικο εγκέφαλο. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν την αύξηση της έκφρασης της πλήρους μήκους APP μέσω της έκφρασης της DDC και των συντετμημένων ισομορφών Alt- DDC και DDC-3. Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας παρουσιάστηκε ένα ενδιαφέρον δεδομένο όπου φαίνεται να επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης της πλήρους μήκους APP σε σύγκριση με τα πειράματα ελέγχου. Δεδομένου του γεγονότος ότι οι τρεις ισομορφές της DDC που μελετήθηκαν, έχουν ομοιότητες και διαφορές στην αλληλουχία τους και ότι η τεταρτοταγής δομή των δύο συντετμημένων ισομορφών δεν είναι γνωστή, θα μπορούσε ο ρόλος τους να έχει είτε δομικό χαρακτήρα, είτε ρυθμιστικό μέσω διαφορετικών μονοπατιών, ελέγχοντας έμμεσα με ρυθμιστικά μόρια την έκφραση και το μεταβολισμό της APP.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθούμε και στη διαφορετική δράση της DDC και των ισομορφών αυτής στη δημιουργία των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP. Τα πειράματά μας κατέδειξαν τη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων στα ~180 kDa, τα οποία περιέχουν τόσο τον επίτοπο του αμυλοειδούς όσο και τον επίτοπο της καρβοξυτελικής περιοχής, υπονοώντας την παρουσία πολλών συμπλοκοποιημένων θραυσμάτων ή τη συμπλοκοποίηση της πλήρους μήκους APP με θραύσματά της. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η APP ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη, κατέχει την κυτταρική διαμόρφωση ενός υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια με μια μεγάλη ενδοκυτταρική περιοχή, μία μονή διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτοσολική περιοχή, η οποία πιθανώς να εμπλέκεται στους μηχανισμούς σηματοδότησης ή στην αναγνώριση της APP από την DDC. Η ανίχνευση των συμπλόκων έγινε με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου, καθώς και επιτόπου του Αβ. Υπάρχοντα βιοχημικά και δομικά δεδομένα για την APP, η οποία έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί ομοδιμερή, καθώς και ετεροδιμερή με τις πρωτεϊνικές ισομορφές της APLP1 και APLP2 (amyloid precursor like proteins) [314]. Έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις APP- APP στην κυτταρική επιφάνεια, με ομοιοπολική σύνδεση της APP με την πλασματική μεμβράνη. Πολλά δεδομένα έδειξαν ότι μια θηλειά με δισουλφιδικούς δεσμούς, που περιλαμβάνει τα καταλείμματα 91- 111, είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση των ομοδιμερών της APP. Σε πειράματα αντικατάστασης της θηλειάς με πεπτίδιο που τη μιμείται, η αλληλεπίδραση αυτή μειώνεται. Αναφέρεται επίσης, πως το συνθετικό αυτό πεπτίδιο, αν προστεθεί σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν την APP, μπορεί να μειώσει την παραγωγή των πεπτιδίων sAPPβ, καθώς και των Αβ40 και Αβ42, υποδεικνύοντας πως η κατάσταση ισορροπίας μονομερών/ διμερών της APP, μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθολογία της AD [315]. Επίσης, χημικά επαγόμενος διμερισμός της APP, οδήγησε στη μειωμένη πρωτεόλυση της APP και κατ' επέκταση σε μειωμένα επίπεδα του Αβ. Επιπλέον, ετεροδιμερισμός της με τα ομόλογά της APLP1 και

APLP2, είχε σαν αποτέλεσμα την εξάλειψη του σχηματισμού του Αβ [316]. Τα αποτελέσματά μας, συμφωνούν με τις παραπάνω παρατηρήσεις, η αύξηση του ανοσοεντοπισμού των υψηλομοριακών συμπλόκων (στα ~180 kDa) της APP παρουσία της DDC και των ισομορφών της, είναι πιθανό η παρουσία των ισομορφών της DDC να διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στη δημιουργία συμπλόκων και μέσω της ρύθμισης αυτής να επηρεάζεται ο αμυλοειδογενής καταβολισμός της APP. Τα παρατηρούμενα σύμπλοκα περιέχουν τον καρβοξυτελικό επίτοπο και τον επίτοπο του Αβ, γεγονός το οποίο υποδεικνύει την παρουσία της πλήρους μήκους APP στα σύμπλοκα αυτά. Επίσης, τα τελευταία παρουσιάζουν διαφορετικό μοτίβο εμφάνισης ανάλογα με τις εκφραζόμενη μορφή της DDC.

Οι επόμενοι ερευνητικοί στόχοι της εργασίας, ήταν να ερευνηθούν παράγοντες που τροποποιούν τη βιολογική δράση της DDC στην πρωτεολυτική επεξεργασία, στην έκφραση της πλήρους μήκους, καθώς και στη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων της APP. Υπογραμμίζεται πως δεν υπάρχει καμία μελέτη που να υποδεικνύει τη δράση των ρυθμιστικών παραγόντων στις συντετμημένες μορφές της DDC. Η δράση της DA έχει μελετηθεί σε ότι αφορά τη συσσώρευση ινιδίων του Αβ και της ASYN. Έρευνες έχουν δείξει πως η DA, αναστέλλει όχι μόνο τη συσσώρευση ινιδίων του Αβ και της ASYN, αλλά και την αποικοδόμηση των ινιδίων ASYN και Αβ [225]. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν, πως η εξωγενής χορήγηση της DA επάγει την επίδραση της DDC επί της APP. Με τον τρόπο αυτό, επιβεβαιώνεται η εμπλοκή της DDC στη έκφραση των διμερών της APP. Το ίδιο πρότυπο επαναλαμβάνεται και στην περίπτωση της πρωτεόλυσης. Η εξωγενής χορήγηση DA, αυξάνει την έκφραση των καρβοξυτελικών και αμυλοειδογενών θραυσμάτων, στην περιοχή μεταξύ των 48 έως και των 100 kDa, στην κυτταρική σειρά CHO/ DDC. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει και την αύξηση του καταβολισμού της APP. Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται και στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς CHO/ DDC-3, με τη διαφορά εδώ ότι στην περιοχή ανάμεσα από τα 48 και 63 kDa, το ειδικό αντίσωμα έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής ανίχνευσε ελάχιστα θραύσματα της APP στις κυτταρικές σειρές στις οποίες χορηγήθηκε η DA. Αυτό μας μαρτυρά, πως η ισομορφή DDC-3 αναστέλλει τον καταβολισμό της APP, παρουσία DA και φαίνεται πως η DA πιθανώς να έχει ανασταλτικό ρόλο στην ισομορφή DDC-3. Αντιθέτως, στην κυτταρική σειρά Alt- DDC, τα υψηλομοριακά σύμπλοκα της APP, πάνω από τα 180 kDa, φαίνεται να μειώνονται παρουσία της DA. Σε περίπτωση που οι δύο αυτές ισομορφές δεν έχουν ενζυμική ενεργότητα, η DA μπορεί είτε να παρεμποδίζει τη δημιουργία αμυλοειδικών ινιδίων, ετερομερών ή και όχι, είτε να τα διασπά και ως εκ τούτου συμπεραίνουμε για άλλη μια φορά τον ενεργό ρόλο της DDC στον καταβολισμό της APP. Η διαφορική εμφάνιση των υψηλομοριακών συμπλόκων μπορεί να καταδεικνύει διαφορετική τροποποίηση των συμμετεχόντων μορίων, από κάθε μια από τις ισομορφές που μελετήθηκαν,

Στην περίπτωση της carbidopa, ενός ενζυμικού αναστολέα της DDC, τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν για άλλη μια φορά τον ενεργό ρόλο της DDC στη δημιουργία συμπλόκων της APP. Η εξωγενής χορήγηση carbidopa, κυρίως σε συγκεντρώσεις 100μΜ, είχε σαν συνέπεια την αύξηση του σχηματισμού των συμπλόκων της APP. Αντιθέτως, στην περίπτωση της ισομορφής DDC-3, η αναστολή της μέσω carbidopa μείωσε το σχηματισμό τους. Ο καταβολισμός της APP, παρουσία carbidopa στην κυτταρική σειρά CHO/DDC δεν παρουσιάζει κάποια έντονη διακύμανση. Η carbidopa φαίνεται να μην έχει κάποια επίδραση στην πρωτεόλυση της APP. Στην κυτταρική σειρά CHO/DDC-3 παρατηρούμε, πως η carbidopa επάγει την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στα 63 kDa, ενώ φαίνεται πως σε χαμηλότερα μοριακά βάρη την αναστέλλει. Στην περίπτωση της Alt- DDC, από την άλλη, η επίδραση της carbidopa είναι εμφανής. Η αναστολή που προκαλεί στην εναλλακτική αυτή ισομορφή, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του καταβολισμού της APP στα 75 kD, αλλά και ανάμεσα από τα 48- 63 kDa. Κατά συνέπεια, μειώνεται και η παραγωγή αμυλοειδογενών θραυσμάτων. Συνεπώς, η DDC φαίνεται να διαδραματίζει τεράστιο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης, της πρωτεόλυσης, της διακίνησης της APP, καθώς και στις αλληλεπιδράσεις διαφόρων αγνώστων πρωτεϊνών, μιας και δεν αποκλείεται η συμμετοχή τους και οι οποίες δεν εμφανίζονται, πέρα από τη συμμετοχή του αμυλοειδογενούς και του καρβοξυτελικού επιτόπου.

Σε μια προσπάθεια μελέτης της χημικής απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκε η σταυροσπορίνη, μία τοξίνη που απομονώνεται από βακτήρια *Streptomyces staurospores*, χρησιμοποιείται ευρέως ως αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης C, στην έρευνα μεταγωγής σήματος [317]. Δεν αποτελεί μόνο έναν προ- αποπτωτικό παράγοντα, αλλά έχει αναφερθεί και ως ένας επαγωγέας διαφοροποίησης αρκετών κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος. Έρευνες που γίνανε με θεραπεία STS σε κυτταρικές σειρές, δείχνανε πως αυξάνεται η έκφραση και η πρωτεόλυση της APP [318], ενώ άλλες δείχνανε πως η δοσο-εξαρτώμενη χορήγηση STS μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής APP [317]. Στην περίπτωση της DDC, η STS, συγκέντρωσης 100nM, έδρασε αυξάνοντας τη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων της APP και στις τρεις κυτταρικές σειρές (CHO/DDC, CHO/ DDC-3, CHO/ Alt- DDC), σε αντίθεση με το δείγμα ελέγχου CHO το οποίο επωάστηκε με ίση συγκέντρωση STS. Επίσης, η χορήγηση STS επηρέασε και τον καταβολισμό της APP, αφού στην περιοχή των 82 kDa η DDC φαίνεται να καταβολίζει την APP, ενώ στην περίπτωση των CHO, δεν παρατηρείται καμία ζώνη και ως εκ τούτου, συμπεραίνουμε πως η παρουσία της DDC και των ισομορφών της, είναι απαραίτητες για τον μεταβολισμό της APP, παρουσία STS, ακόμη και σε συγκέντρωση μη επαρκής για την αύξηση των διμερών αλλά και των θραυσμάτων της APP. Το ίδιο παρατηρούμε και στην περίπτωση της πλήρους μήκους APP περίπου στα 115 kDa. Βέβαια, η συγκέντρωση αυτή της STS φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα

της APP, είτε αυτά είναι διμερή, είτε η πλήρους μήκους APP, ακόμη και τα θραύσματά της. Από την άλλη συγκέντρωση 200nM STS, έδειξε να αυξάνει σε μεγάλο βαθμό τη δημιουργία συμπλόκων της APP (180 kDa), την πλήρους μήκους πρωτεΐνη (115 kDa) και των θραυσμάτων της (64- 100 kDa), σε όλες τις κυτταρικές σειρές, αλλά κυρίως στις CHO/DDC-3 και CHO/Alt- DDC.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ο φυσικός αναστολέας Αννεξίνη V της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας της DDC, για να επαληθεύσουμε τη συμμετοχή της τελευταίας στην πρωτεόλυση της APP. Έχει διαπιστωθεί από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, ότι η Αννεξίνη V είναι ένα μόριο το οποίο εμπλέκεται στην απόπτωση και συμμετέχει στην ειδική ενζυμική ενεργότητα της DDC (Χαλατσά, 2012). Έτσι και εδώ, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την αναστολή του ενζύμου, στην διπλά επιμολυσμένη κυτταρική σειρά CHO/DDC-A5, με αποτέλεσμα τη θεαματική μείωση των θραυσμάτων της APP (από τα 35 έως και τα 63 kDa). Παρατηρούμε και πάλι, πως ακόμη και στην περίπτωση της ισομορφής DDC-3, που θεωρείται η ισομορφή με ανενεργή ενζυμική ενεργότητα, η πρωτεόλυση της APP, λαμβάνει χώρα απουσία του αναστολέα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, θεωρείται πιθανή η συμμετοχή του ενζύμου της DDC στην έκφραση, στη δημιουργία συμπλόκων και στην πρωτεόλυση της APP. Η παρατήρηση αυτή, ενισχύεται από το γεγονός ότι παρουσία είτε του φυσικού αναστολέα Αννεξίνη V, είτε του χημικού αναστολέα της ενζυμικής ενεργότητας της DDC, οι διαδικασίες που αναφερθήκαν σε σχέση με την επεξεργασία της APP. Θα μπορούσε λοιπόν να υποστηριχθεί ότι η αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας της DDC, δρα προστατευτικά στη δημιουργία αμυλοειδικών πλακών, που είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα της AD. Σε συνδυασμό με πρόσφατες μελέτες που έγιναν για την επίδραση που έχει στην τοξικότητα της πρωτεΐνης tau, φαίνεται να αποτελεί ένζυμο- κλειδί και στη νόσο AD. Επίσης, στη νόσο PD, η DDC είναι το καθοριστικό ένζυμο (rate- limiting) για τη σύνθεση της DA. Όταν χορηγείται L-Dopa, οποιαδήποτε αλλαγή στην ενζυμική ενεργότητα της DDC, θα μπορούσε να είναι κλινικής σπουδαιότητας. Τα μέχρι στιγμής κλινικά δεδομένα, υποδηλώνουν πως η L-Dopa, μπορεί να έχει σύνθετες προ- και αντιοξειδωτικές επιδράσεις, που συμβάλλουν στον εκφυλισμό των κυττάρων λόγω οξειδωτικού στρες [319].

Χρήσιμο θα ήταν να ελεγχθούν και οι υπόλοιποι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης της DDC με την APP, σε συνδυασμό με τη χορήγηση και άλλων ρυθμιστικών παραγόντων που θα επηρέαζαν τη λειτουργία του ενζύμου, με έκθεση των κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των αναστολέων ή σε διαφορετικό χρόνο έκθεσης. Οι παράγοντες ρύθμισης (DA, carbidopa, α- methyl-dopa, L-Dopa, NSD), είναι πολύ βασικό να χρησιμοποιηθούν σε κυτταρική σειρά CHO, που θα αποτελεί μάρτυρα για τις επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές με το cDNA της DDC και των ισομορφών, κάτι το οποίο δεν

καταφέραμε να πραγματοποιήσουμε, λόγω τεχνικών προβλημάτων. Πειράματα ανοσοκατακρίμνησης και ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης μέσω αντισωμάτων, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση αυτής της σχέσης. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, μερικά πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης θα μπορούσαν να δώσουν στοιχεία για τις περιοχές που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση των δύο μορίων. Επιπλέον, θα μπορούσε να μελετηθεί ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης και πρωτεόλυσης της APP, αλλά και της DDC και των ισομορφών της με τη διαδικασία της real time PCR, ώστε να ελεγχθεί μία πιθανή πορεία ενεργοποίησης της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων.

Από την παρούσα εργασία, προκύπτουν νέα δεδομένα για τη βιολογική δράση της DDC και των ισομορφών της. Υπογραμμίζεται ότι ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος του ενζύμου τόσο στο ΚΝΣ, όσο και στην περιφέρεια, τόσο σε φυσιολογική κατάσταση όσο και σε παθογενετικούς μηχανισμούς. Παντελώς άγνωστος παραμένει ο λειτουργικός ρόλος των ισομορφών της ανθρώπινης DDC που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα δεδομένα μας, δημιουργούν πολλαπλά και νέα ερωτήματα για τους μηχανισμούς που οδηγούν στον νευροεκφυλισμό. Προσθέτουν δε νέους μοριακούς στόχους για την αποσαφήνιση των μηχανισμών που οδηγούν στο νευρωνικό θάνατο. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματά μας, καταδεικνύουν την εμπλοκή της L- DOPA αποκαρβοξυλάσης στη δημιουργία αμυλοειδογενών θραυσμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να λειτουργήσουν προσθετικά στην παθογένεση της AD. Οι νέες ερευνητικές κατευθύνσεις που γεννώνται μέσω των αποτελεσμάτων μας είναι πολλαπλές. Συγκεκριμένα προκύπτουν ερωτήματα για το ρόλο των ισομορφών του ενζύμου στην έκφραση της APP, στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, στη ρύθμιση της πρωτεολυτικής κατεργασίας της APP, είτε κατά το αμυλοειδογενές μονοπάτι, είτε κατά την έκκριση αμυλοειδογενών ή μη θραυσμάτων της APP. Υπενθυμίζεται ότι η συσσώρευση του Αβ εμπλέκεται στην παθογένεση της AD, αλλά και στην παθογένεση άλλων νευροεκφυλιστικών νόσων όπως η PD. Τα αποτελέσματά μας προσφέρουν νέες ενδείξεις ότι οι παθογενετικοί μηχανισμοί νευροεκφυλισμού μπορεί να διασυνδέονται σε μοριακό επίπεδο. Η διασύνδεση αυτή μπορεί να επισυμβαίνει κατά τη διάρκεια της άγνωστης περιόδου προ- επώασης της νόσου. Οι μοριακοί μηχανισμοί θα μπορούσαν να συμπεριλαμβάνουν βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη διατάραξη της ισορροπίας και ομοιοστασίας του ντοπαμινεργικού συστήματος (χαρακτηριστικό της παθολογίας της PD), σε σχέση με το μεταβολισμό και την έκφραση της APP. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία, η περαιτέρω μελέτη των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας συνηγορούν και προσθέτουν νέα δεδομένα στην ύπαρξη κοινών μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών στην παθογένεση νευροεκφυλιστικών νόσων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kovacs GG, Breydo L, Green R, Kis V, Puska G, Lőrincz P, Perju-Dumbrava L, Giera R, Pirker W, Lutz M *et al*: **Intracellular processing of disease-associated α -synuclein in the human brain suggests prion-like cell-to-cell spread.** *Neurobiology of disease* 2014, **69**(Supplement C):76-92.
2. Heemels M-T: **Neurodegenerative diseases.** *Nature* 2016, **539**:179.
3. Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P: **Cell death in the nervous system.** *Nature* 2006, **443**(7113):796-802.
4. Rubinsztein DC: **The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration.** *Nature* 2006, **443**(7113):780-786.
5. Kovacs GG, Budka H: **Current concepts of neuropathological diagnostics in practice: neurodegenerative diseases.** *Clinical neuropathology* 2010, **29**(5):271-288.
6. Rizzo G, Martinelli P, Manners D, Scaglione C, Tonon C, Cortelli P, Malucelli E, Capellari S, Testa C, Parchi P *et al*: **Diffusion-weighted brain imaging study of patients with clinical diagnosis of corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease.** *Brain* 2008:2690-2700.
7. McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM: **alpha-Synucleinopathy phenotypes.** *Parkinsonism & related disorders* 2014, **20** Suppl 1:S62-67.
8. Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA: **Molecular pathways to neurodegeneration.** *Nature medicine* 2004, **10** Suppl:S2-9.
9. Santiago JA, Bottero V, Potashkin JA: **Dissecting the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases through Network Biology.** *Frontiers in Aging Neuroscience* 2017, **9**:166.
10. Bertram L, Tanzi RE: **The genetic epidemiology of neurodegenerative disease.** *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**(6):1449-1457.
11. Valastyan JS, Lindquist S: **Mechanisms of protein-folding diseases at a glance.** *Disease Models & Mechanisms* 2014, **7**(1):9-14.
12. Bayer TA: **Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders?** *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2015, **25**(5):713-724.
13. Kesidou E, Lagoudaki R, Touloumi O, Poulatsidou KN, Simeonidou C: **Autophagy and neurodegenerative disorders.** *Neural regeneration research* 2013, **8**(24):2275-2283.
14. Nijholt DA, De Kimpe L, Elfrink HL, Hoozemans JJ, Scheper W: **Removing protein aggregates: the role of proteolysis in neurodegeneration.** *Current medicinal chemistry* 2011, **18**(16):2459-2476.
15. Varkey J, Isas JM, Mizuno N, Jensen MB, Bhatia VK, Jao CC, Petrlova J, Voss JC, Stamou DG, Steven AC *et al*: **Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins.** *The Journal of biological chemistry* 2010, **285**(42):32486-32493.
16. Bingol B, Tea JS, Phu L, Reichelt M, Bakalarski CE, Song Q, Foreman O, Kirkpatrick DS, Sheng M: **The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy.** *Nature* 2014, **510**(7505):370-375.
17. Beal MF: **Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment.** *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2004, **36**(4):381-386.

18. Lin MT, Beal MF: **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases.** *Nature* 2006, **443**(7113):787-795.
19. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G: **Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2007, **8**(9):741-752.
20. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH *et al*: **Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders.** *Progress in neurobiology* 2014, **112**:24-49.
21. Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA: **mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy.** *Neurobiology of disease* 2015, **84**:39-49.
22. Faigle R, Song H: **Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis.** *Biochimica et biophysica acta* 2013, **1830**(2):2435-2448.
23. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH: **Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration.** *Cell* 2010, **140**(6):918-934.
24. Hensley K: **Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation.** *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2010, **21**(1):1-14.
25. Sankowski R, Mader S, Valdes-Ferrer SI: **Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration.** *Frontiers in cellular neuroscience* 2015, **9**:28.
26. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM: **Accelerated telomere shortening in response to life stress.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(49):17312-17315.
27. Li Z, Ma L, Kuleshkaya N, Voikar V, Tian L: **Microglia are polarized to M1 type in high-anxiety inbred mice in response to lipopolysaccharide challenge.** *Brain, behavior, and immunity* 2014, **38**:237-248.
28. Lima IVdA, Bastos LFS, Limbor, #xe7, o-Filho M, Fiebich BL, de Oliveira ACP: **Role of Prostaglandins in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Diseases.** *Mediators of Inflammation* 2012, **2012**:13.
29. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM: **The role of inflammation in CNS injury and disease.** *British journal of pharmacology* 2006, **147 Suppl 1**:S232-240.
30. Gao HM, Hong JS: **Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression.** *Trends in immunology* 2008, **29**(8):357-365.
31. Meza-Sosa KE, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L: **microRNAs: key triggers of neuronal cell fate.** *Frontiers in cellular neuroscience* 2014, **8**.
32. Weiner HL, Frenkel D: **Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease.** *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(5):404-416.
33. Selkoe DJ: **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.** *Physiological reviews* 2001, **81**(2):741-766.
34. Johansson JU, Woodling NS, Wang Q, Panchal M, Liang X, Trueba-Saiz A, Brown HD, Mhatre SD, Loui T, Andreasson KI: **Prostaglandin signaling suppresses beneficial microglial function in Alzheimer's disease models.** *The Journal of clinical investigation* 2015, **125**(1):350-364.

35. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD *et al*: **Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers.** *The Lancet Neurology* 2013, **12**(2):207-216.
36. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM *et al*: **Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease.** *The New England journal of medicine* 2012, **367**(9):795-804.
37. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ *et al*: **Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease.** *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2011, **7**(3):280-292.
38. Forstl H, Kurz A: **Clinical features of Alzheimer's disease.** *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 1999, **249**(6):288-290.
39. Schellenberg GD, Anderson L, O'Dahl S, Wisjman EM, Sadovnick AD, Ball MJ, Larson EB, Kukull WA, Martin GM, Roses AD *et al*: **APP717, APP693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease.** *American Journal of Human Genetics* 1991, **49**(3):511-517.
40. Reinhard C, Hébert SS, De Strooper B: **The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function.** *The EMBO Journal* 2005, **24**(23):3996-4006.
41. Herreman A, Van Gassen G, Bentahir M, Nyabi O, Craessaerts K, Mueller U, Annaert W, De Strooper B: **gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation.** *Journal of cell science* 2003, **116**(Pt 6):1127-1136.
42. Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H: **Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity.** *Nature* 1988, **331**(6156):530-532.
43. Buxbaum JD, Greengard P: **Regulation of APP processing by intra- and intercellular signals.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996, **777**:327-331.
44. Yanker BA: **New clues to Alzheimer's disease: Unraveling the roles of amyloid and tau.** *Nature medicine* 1996, **2**:850.
45. Cuchillo-Ibanez I, Lopez-Font I, Boix-Amoros A, Brinkmalm G, Blennow K, Molinuevo JL, Saez-Valero J: **Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid.** *Molecular neurodegeneration* 2015, **10**:2.
46. Andrew RJ, Kellett KA, Thinakaran G, Hooper NM: **A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis.** 2016, **291**(37):19235-19244.
47. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S: **Trafficking and Proteolytic Processing of APP.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012, **2**(5):a006270.
48. Norstrom E: **Metabolic processing of the amyloid precursor protein -- new pieces of the Alzheimer's puzzle.** *Discovery medicine* 2017, **23**(127):269-276.
49. Zheng H, Koo EH: **The amyloid precursor protein: beyond amyloid.** *Molecular neurodegeneration* 2006, **1**(1):5.
50. Oster-Granite ML, McPhie DL, Greenan J, Neve RL: **Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid**

- precursor protein.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1996, **16**(21):6732-6741.
51. Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH: **Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity.** *Journal of neurochemistry* 2003, **87**(3):733-741.
 52. Bertrand E, Brouillet E, Caille I, Bouillot C, Cole GM, Prochiantz A, Allinquant B: **A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo.** *Molecular and cellular neurosciences* 2001, **18**(5):503-511.
 53. Galvan V, Gorostiza OF, Banwait S, Ataie M, Logvinova AV, Sitaraman S, Carlson E, Sagi SA, Chevallier N, Jin K *et al*: **Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(18):7130-7135.
 54. Trojanowski JQ, Lee VM: **Brain degeneration linked to "fatal attractions" of proteins in Alzheimer's disease and related disorders.** *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2001, **3**(1):117-119.
 55. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L: **The Many Faces of Tau.** *Neuron* 2011, **70**(3):410-426.
 56. Jho YS, Zhulina EB, Kim MW, Pincus PA: **Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation.** *Biophysical journal* 2010, **99**(8):2387-2397.
 57. Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D: **Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease.** *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012, **2012**.
 58. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT: **Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*: 2011, **1**(1):a006189.
 59. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT: **Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease.** *Neurology* 1992, **42**(3 Pt 1):631-639.
 60. Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR: **Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease.** *Neurology* 2003, **60**(9):1495-1500.
 61. Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC: **Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain.** *Neurology* 2004, **62**(6):925-931.
 62. Bagyinszky E, Youn YC, An SSA, Kim SY: **The genetics of Alzheimer's disease.** *Clinical Interventions in Aging* 2014, **9**:535-551.
 63. De Luca V, Orfei MD, Gaudenzi S, Caltagirone C, Spalletta G: **Inverse effect of the APOE epsilon4 allele in late- and early-onset Alzheimer's disease.** *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 2016, **266**(7):599-606.
 64. Weidemann A, Paliga K, Durrwang U, Czech C, Evin G, Masters CL, Beyreuther K: **Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein.** *Nature medicine* 1997, **3**(3):328-332.
 65. Lanoiselee HM, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, Richard AC, Pasquier F, Rollin-Sillaire A, Martinaud O *et al*: **APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases.** *PLoS medicine* 2017, **14**(3):e1002270.

66. Kruger J, Moilanen V, Majamaa K, Remes AM: **Molecular genetic analysis of the APP, PSEN1, and PSEN2 genes in Finnish patients with early-onset Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration.** *Alzheimer disease and associated disorders* 2012, **26**(3):272-276.
67. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H: **Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease.** *Nature reviews Neurology* 2010, **6**(3):131-144.
68. Goldberg MS, Lansbury PT, Jr.: **Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease?** *Nature cell biology* 2000, **2**(7):E115-119.
69. Daadi MM, Grueter BA, Malenka RC, Redmond DE, Jr., Steinberg GK: **Dopaminergic neurons from midbrain-specified human embryonic stem cell-derived neural stem cells engrafted in a monkey model of Parkinson's disease.** *PloS one* 2012, **7**(7):e41120.
70. Dawson TM, Dawson VL: **Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease.** *Science* 2003, **302**(5646):819.
71. Lees AJ, Hardy J, Revesz T: **Parkinson's disease.** *Lancet (London, England)* 2009, **373**(9680):2055-2066.
72. Jankovic J: **Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2008, **79**(4):368-376.
73. Dickson DW: **Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012, **2**(8).
74. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M: **Alpha-synuclein in Lewy bodies.** *Nature* 1997, **388**(6645):839-840.
75. Samii A, Nutt JG, Ransom BR: **Parkinson's disease.** *Lancet (London, England)* 2004, **363**(9423):1783-1793.
76. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag A-E, Lang AE: **Parkinson disease.** *Nature Reviews Disease Primers* 2017, **3**:17013.
77. Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM: **Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases.** *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2008, **14**(7-8):451-464.
78. Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E: **Parkinsonism among Gaucher disease carriers.** *Journal of medical genetics* 2004, **41**(12):937-940.
79. Beavan MS, Schapira AH: **Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease.** *Annals of medicine* 2013, **45**(8):511-521.
80. Fernandes HJ, Hartfield EM, Christian HC, Emmanouilidou E, Zheng Y, Booth H, Bogetofte H, Lang C, Ryan BJ, Sardi SP *et al*: **ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular alpha-Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons.** *Stem cell reports* 2016, **6**(3):342-356.
81. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Graham AR, Brown E, McLean JR, Hayes MA, Beagan J, Izen SC *et al*: **Sustained Systemic Glucocerebrosidase Inhibition Induces Brain alpha-Synuclein Aggregation, Microglia and Complement C1q Activation in Mice.** *Antioxidants & redox signaling* 2015, **23**(6):550-564.
82. Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D *et al*: **Comparison of kindreds with**

- parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications.** *Annals of neurology* 2004, 55(2):174-179.
83. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H *et al*: **Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease.** *Annals of neurology* 2006, 59(2):298-309.
 84. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R *et al*: **alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease.** *Science* 2003, 302(5646):841.
 85. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L: **Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells.** *The Journal of biological chemistry* 2008, 283(35):23542-23556.
 86. Dunnett SB, Bjorklund A: **Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease.** *Nature* 1999, 399(6738 Suppl):A32-39.
 87. Jesse S, Steinacker P, Lehnert S, Gillardon F, Hengerer B, Otto M: **Neurochemical Approaches in the Laboratory Diagnosis of Parkinson and Parkinson Dementia Syndromes: A Review.** *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2009, 15(2):157-182.
 88. Leong SL, Cappai R, Barnham KJ, Pham CL: **Modulation of alpha-synuclein aggregation by dopamine: a review.** *Neurochemical research* 2009, 34(10):1838-1846.
 89. Goedert M: **Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases.** *Nature reviews Neuroscience* 2001, 2(7):492-501.
 90. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T: **The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system.** *Neuron* 1995, 14(2):467-475.
 91. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW: **Understanding the molecular causes of Parkinson's disease.** *Trends in molecular medicine* 2006, 12(11):521-528.
 92. Clayton DF, George JM: **The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease.** *Trends in neurosciences* 1998, 21(6):249-254.
 93. Diao J, Burre J, Vivona S, Cipriano DJ, Sharma M, Kyoung M, Sudhof TC, Brunger AT: **Native alpha-synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2.** *eLife* 2013, 2:e00592.
 94. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ: **A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002, 22(8):3090-3099.
 95. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L: **Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders.** *The Lancet Neurology* 2011, 10(11):1015-1025.
 96. Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Jr., Browne G: **Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states.** *Journal of molecular biology* 2001, 307(4):1061-1073.
 97. Kessler JC, Rochet JC, Lansbury PT, Jr.: **The N-terminal repeat domain of alpha-synuclein inhibits beta-sheet and amyloid fibril formation.** *Biochemistry* 2003, 42(3):672-678.
 98. Sato H, Kato T, Arawaka S: **The role of Ser129 phosphorylation of alpha-synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models.** *Reviews in the neurosciences* 2013, 24(2):115-123.

99. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R *et al*: **Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.** *Science* 1997, **276**(5321):2045-2047.
100. Perrin RJ, Woods WS, Clayton DF, George JM: **Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(44):34393-34398.
101. Beyer K: **Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers.** *Acta neuropathologica* 2006, **112**(3):237-251.
102. Flagmeier P, Meisl G: **Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of alpha-synuclein aggregation.** 2016, **113**(37):10328-10333.
103. Brundin P, Melki R, Kopito R: **Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2010, **11**(4):301-307.
104. Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M: **Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007, **27**(34):9220-9232.
105. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K: **Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry.** *Acta neuropathologica* 2006, **112**(4):389-404.
106. Breydo L, Wu JW, Uversky VN: **Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease.** *Biochimica et biophysica acta* 2012, **1822**(2):261-285.
107. Bisaglia M, Tosatto L, Munari F, Tessari I, de Laureto PP, Mammi S, Bubacco L: **Dopamine quinones interact with alpha-synuclein to form unstructured adducts.** *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **394**(2):424-428.
108. Herrera FE, Chesi A, Paleologou KE, Schmid A, Munoz A, Vendruscolo M, Gustincich S, Lashuel HA, Carloni P: **Inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopamine is mediated by interactions with five C-terminal residues and with E83 in the NAC region.** *PloS one* 2008, **3**(10):e3394.
109. Adam WR, Culvenor AJ, Hall J, Jarrott B, Wellard RM: **Aromatic L-amino acid decarboxylase: histochemical localization in rat kidney and lack of effect of dietary potassium or sodium loading on enzyme distribution.** *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 1986, **13**(1):47-53.
110. Lindstrom P, Sehlin J: **Mechanisms underlying the effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan in pancreatic islets. A proposed role for L-aromatic amino acid decarboxylase.** *Endocrinology* 1983, **112**(4):1524-1529.
111. Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S: **Aromatic L-amino acid decarboxylase.** *The Journal of biological chemistry* 1962, **237**:89-93.
112. Poulidakos P, Vassilacopoulou D, Fragoulis EG: **L-DOPA Decarboxylase Association with Membranes in Mouse Brain.** *Neurochemical research* 2001, **26**(5):479-485.
113. Bertoldi M: **Mammalian Dopa decarboxylase: structure, catalytic activity and inhibition.** *Archives of biochemistry and biophysics* 2014, **546**:1-7.
114. Nagatsu T, Ichinose H, Kojima K, Kameya T, Shimase J, Kodama T, Shimosato Y: **Aromatic l-amino acid decarboxylase activities in human lung tissues: Comparison between normal lung and lung carcinomas.** *Biochemical Medicine* 1985, **34**(1):52-59.

115. Kaufman S: **Tyrosine hydroxylase**. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 1995, **70**:103-220.
116. Christenson JG, Dairman W, Udenfriend S: **Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney**. *Archives of biochemistry and biophysics* 1970, **141**(1):356-367.
117. Ando-Yamamoto M, Hayashi H, Sugiyama T, Fukui H, Watanabe T, Wada H: **Purification of L-dopa decarboxylase from rat liver and production of polyclonal and monoclonal antibodies against it**. *Journal of biochemistry* 1987, **101**(2):405-414.
118. Shirota K, Fujisawa H: **Purification and characterization of aromatic L-amino acid decarboxylase from rat kidney and monoclonal antibody to the enzyme**. *Journal of neurochemistry* 1988, **51**(2):426-434.
119. Nishigaki I, Ichinose H, Tamai K, Nagatsu T: **Purification of aromatic L-amino acid decarboxylase from bovine brain with a monoclonal antibody**. *The Biochemical journal* 1988, **252**(2):331-335.
120. Albert VR, Allen JM, Joh TH: **A single gene codes for aromatic L-amino acid decarboxylase in both neuronal and non-neuronal tissues**. *The Journal of biological chemistry* 1987, **262**(19):9404-9411.
121. Mappouras DG, Stiakakis J, Fragoulis EG: **Purification and characterization of L-dopa decarboxylase from human kidney**. *Molecular and cellular biochemistry* 1990, **94**(2):147-156.
122. Siow YL, Dakshinamurti K: **Purification of dopa decarboxylase from bovine striatum**. *Molecular and cellular biochemistry* 1990, **94**(2):121-131.
123. Maneckjee R, Baylin SB: **Use of radiolabeled monofluoromethyl-Dopa to define the subunit structure of human L-Dopa decarboxylase**. *Biochemistry* 1983, **22**(26):6058-6063.
124. Clark WC, Doctor J, Fristrom JW, Hodgetts RB: **Differential responses of the dopa decarboxylase gene to 20-OH-ecdysone in Drosophila melanogaster**. *Developmental biology* 1986, **114**(1):141-150.
125. Ichinose H, Kojima K, Togari A, Kato Y, Parvez S, Parvez H, Nagatsu T: **Simple purification of aromatic L-amino acid decarboxylase from human pheochromocytoma using high-performance liquid chromatography**. *Analytical biochemistry* 1985, **150**(2):408-414.
126. Burkhard P, Dominici P, Borri-Voltattorni C, Jansonius JN, Malashkevich VN: **Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase**. *Nature structural biology* 2001, **8**(11):963-967.
127. Maras B, Dominici P, Barra D, Bossa F, Voltattorni CB: **Pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) decarboxylase. Primary structure and relationships to other amino acid decarboxylases**. *European journal of biochemistry* 1991, **201**(2):385-391.
128. Aurora R, Rose GD: **Helix capping**. *Protein science : a publication of the Protein Society* 1998, **7**(1):21-38.
129. Jansonius JN: **Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes**. *Current opinion in structural biology* 1998, **8**(6):759-769.
130. Tancini B, Dominici P, Simmaco M, Schininà ME, Barra D, Voltattorni CB: **Limited tryptic proteolysis of pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase**. *Archives of biochemistry and biophysics* 1988, **260**(2):569-576.

131. Ishii S, Mizuguchi H, Nishino J, Hayashi H, Kagamiyama H: **Functionally important residues of aromatic L-amino acid decarboxylase probed by sequence alignment and site-directed mutagenesis.** *Journal of biochemistry* 1996, **120**(2):369-376.
132. Ishii S, Hayashi H, Okamoto A, Kagamiyama H: **Aromatic L-amino acid decarboxylase: conformational change in the flexible region around Arg334 is required during the transaldimination process.** *Protein science : a publication of the Protein Society* 1998, **7**(8):1802-1810.
133. Fenalti G, Law RH, Buckle AM, Langendorf C, Tuck K, Rosado CJ, Faux NG, Mahmood K, Hampe CS, Banga JP *et al*: **GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop.** *Nature structural & molecular biology* 2007, **14**(4):280-286.
134. Matsuda N, Hayashi H, Miyatake S, Kuroiwa T, Kagamiyama H: **Instability of the apo form of aromatic L-amino acid decarboxylase in vivo and in vitro: implications for the involvement of the flexible loop that covers the active site.** *Journal of biochemistry* 2004, **135**(1):33-42.
135. Allen GF, Land JM, Heales SJ: **A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency.** *Molecular genetics and metabolism* 2009, **97**(1):6-14.
136. Bertoldi M, Voltattorni CB: **Multiple roles of the active site lysine of Dopa decarboxylase.** *Archives of biochemistry and biophysics* 2009, **488**(2):130-139.
137. Rahman MK, Nagatsu T, Kato T: **Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates.** *Biochemical pharmacology* 1981, **30**(6):645-649.
138. Rahman MK, Nagatsu T: **Demonstration of aromatic l-amino acid decarboxylase activity in human brain with l-dopa and l-5-hydroxytryptophan as substrates by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.** *Neurochemistry international* 1982, **4**(1):1-6.
139. Sumi C, Ichinose H, Nagatsu T: **Characterization of recombinant human aromatic L-amino acid decarboxylase expressed in COS cells.** *Journal of neurochemistry* 1990, **55**(3):1075-1078.
140. Carlsson A: **The "on-off" effect.** *Advances in neurology* 1974, **5**:367-368.
141. Maycock AL, Aster SD, Patchett AA: **Inactivation of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine decarboxylase by 2-(fluoromethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine.** *Biochemistry* 1980, **19**(4):709-718.
142. Bertoldi M, Gonsalvi M, Voltattorni CB: **Green tea polyphenols: novel irreversible inhibitors of dopa decarboxylase.** *Biochemical and biophysical research communications* 2001, **284**(1):90-93.
143. Jonkers N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y: **Benserazide decreases central AADC activity, extracellular dopamine levels and levodopa decarboxylation in striatum of the rat.** *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 2001, **108**(5):559-570.
144. Black BC, Pentz ES, Wright TR: **The alpha methyl dopa hypersensitive gene, 1(2)amd, and two adjacent genes in Drosophila melanogaster: physical location and direct effects of amd on catecholamine metabolism.** *Molecular & general genetics : MGG* 1987, **209**(2):306-312.

145. Eveleth DD, Gietz RD, Spencer CA, Nargang FE, Hodgetts RB, Marsh JL: **Sequence and structure of the dopa decarboxylase gene of Drosophila: evidence for novel RNA splicing variants.** *The EMBO Journal* 1986, 5(10):2663-2672.
146. Siaterli MZ, Vassilacopoulou D, Fragoulis EG: **Cloning and expression of human placental L-Dopa decarboxylase.** *Neurochemical research* 2003, 28(6):797-803.
147. Sumi-Ichinose C, Ichinose H, Takahashi E, Hori T, Nagatsu T: **Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis.** *Biochemistry* 1992, 31(8):2229-2238.
148. Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Ohye T, Hagino Y, Fujita K, Nagatsu T: **Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic L-amino acid decarboxylase.** *Biochemistry* 1992, 31(46):11546-11550.
149. Ichinose H, Kurosawa Y, Titani K, Fujita K, Nagatsu T: **Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase.** *Biochemical and biophysical research communications* 1989, 164(3):1024-1030.
150. Scherer LJ, McPherson JD, Wasmuth JJ, Marsh JL: **Human dopa decarboxylase: localization to human chromosome 7p11 and characterization of hepatic cDNAs.** *Genomics* 1992, 13(2):469-471.
151. Kokkinou I, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D: **The U937 macrophage cell line expresses enzymatically active L-Dopa decarboxylase.** *Journal of neuroimmunology* 2009, 216(1-2):51-58.
152. Chalatsa I, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D: **Release of membrane-associated L-dopa decarboxylase from human cells.** *Neurochemical research* 2011, 36(8):1426-1434.
153. Tanaka T, Horio Y, Taketoshi M, Imamura I, Ando-Yamamoto M, Kangawa K, Matsuo H, Kuroda M, Wada H: **Molecular cloning and sequencing of a cDNA of rat dopa decarboxylase: partial amino acid homologies with other enzymes synthesizing catecholamines.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86(20):8142-8146.
154. Craig SP, Thai AL, Weber M, Craig IW: **Localisation of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase (DDC) to chromosome 7p13-->p11 by in situ hybridisation.** *Cytogenetics and cell genetics* 1992, 61(2):114-116.
155. Yu Y, Panhuysen C, Kranzler HR, Hesselbrock V, Rounsaville B, Weiss R, Brady K, Farrer LA, Gelernter J: **Intronic variants in the dopa decarboxylase (DDC) gene are associated with smoking behavior in European-Americans and African-Americans.** *Human molecular genetics* 2006, 15(14):2192-2199.
156. Sumi-Ichinose C, Hasegawa S, Ohtsuki M, Nomura H, Nomura T, Hagino Y, Fujita K, Nagatsu T: **Analysis of an alternative promoter that regulates tissue-specific expression of the human aromatic L-amino acid decarboxylase gene in cultured cell lines.** *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 1996, 103(1-2):1-15.
157. Guenter J, Lenartowski R: **Molecular characteristic and physiological role of DOPA-decarboxylase.** *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* 2016, 70(0):1424-1440.
158. Vassilacopoulou D, Sideris DC, Vassiliou AG, Fragoulis EG: **Identification and characterization of a novel form of the human L-dopa decarboxylase mRNA.** *Neurochemical research* 2004, 29(10):1817-1823.

159. Kokkinou I, Nikolouzou E, Hatzimanolis A, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D: **Expression of enzymatically active L-DOPA decarboxylase in human peripheral leukocytes.** *Blood cells, molecules & diseases* 2009, **42**(1):92-98.
160. O'Malley KL, Harmon S, Moffat M, Uhland-Smith A, Wong S: **The human aromatic L-amino acid decarboxylase gene can be alternatively spliced to generate unique protein isoforms.** *Journal of neurochemistry* 1995, **65**(6):2409-2416.
161. Chang YT, Mues G, Hyland K: **Alternative splicing in the coding region of human aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA.** *Neuroscience letters* 1996, **202**(3):157-160.
162. Chalatsa I, Nikolouzou E, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D: **L-Dopa decarboxylase expression profile in human cancer cells.** *Molecular Biology Reports* 2011, **38**(2):1005-1011.
163. Zhu MY, Juorio AV: **Aromatic L-amino acid decarboxylase: biological characterization and functional role.** *General pharmacology* 1995, **26**(4):681-696.
164. Hadjiconstantinou M, Rossetti Z, Silvia C, Krajnc D, Neff NH: **Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the rat retina is modulated in vivo by environmental light.** *Journal of neurochemistry* 1988, **51**(5):1560-1564.
165. Rossetti Z, Krajnc D, Neff NH, Hadjiconstantinou M: **Modulation of Retinal Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase via $\alpha 2$ Adrenoceptors.** *Journal of neurochemistry* 1989, **52**(2):647-652.
166. Rossetti ZL, Silvia CP, Krajnc D, Neff NH, Hadjiconstantinou M: **Aromatic L-amino acid decarboxylase is modulated by D1 dopamine receptors in rat retina.** *Journal of neurochemistry* 1990, **54**(3):787-791.
167. Hadjiconstantinou M, Wemlinger TA, Sylvia CP, Hubble JP, Neff NH: **Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of mouse striatum is modulated via dopamine receptors.** *Journal of neurochemistry* 1993, **60**(6):2175-2180.
168. Kemp BE, Pearson RB: **Protein kinase recognition sequence motifs.** *Trends in biochemical sciences* 1990, **15**(9):342-346.
169. Young EA, Neff NH, Hadjiconstantinou M: **Evidence for cyclic AMP-mediated increase of aromatic L-amino acid decarboxylase activity in the striatum and midbrain.** *Journal of neurochemistry* 1993, **60**(6):2331-2333.
170. Young EA, Neff NH, Hadjiconstantinou M: **Phorbol ester administration transiently increases aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the mouse striatum and midbrain.** *Journal of neurochemistry* 1994, **63**(2):694-697.
171. Christenson JG, Dairman W, Udenfriend S: **On the Identity of DOPA Decarboxylase and 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1972, **69**(2):343-347.
172. Tison F, Normand E, Jaber M, Aubert I, Bloch B: **Aromatic L-amino-acid decarboxylase (DOPA decarboxylase) gene expression in dopaminergic and serotonergic cells of the rat brainstem.** *Neuroscience letters* 1991, **127**(2):203-206.
173. Mackay AV: **Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine.** *The British Journal of Psychiatry* 1980, **137**(4):379.
174. Beltramo M, Krieger M, Calas A, Franzoni MF, Thibault J: **Aromatic amino acid decarboxylase (AADC) immunohistochemistry in vertebrate brainstem with an antiserum raised against AADC made in E. coli.** *Brain research bulletin* 1993, **32**(2):123-132.

175. Arai R, Karasawa N, Nagatsu I: **Aromatic L-amino acid decarboxylase is present in serotonergic fibers of the striatum of the rat. A double-labeling immunofluorescence study.** *Brain research* 1996, **706**(1):177-179.
176. Jaeger CB, Teitelman G, Joh TH, Albert VR, Park DH, Reis DJ: **Some neurons of the rat central nervous system contain aromatic-L-amino-acid decarboxylase but not monoamines.** *Science* 1983, **219**(4589):1233-1235.
177. Park DH, Teitelman G, Evinger MJ, Woo JI, Ruggiero DA, Albert VR, Baetge EE, Pickel VM, Reis DJ, Joh TH: **Phenylethanolamine N-methyltransferase-containing neurons in rat retina: immunohistochemistry, immunochemistry, and molecular biology.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1986, **6**(4):1108-1113.
178. Chanson P, Salenave S: **Diagnosis and treatment of pituitary adenomas.** *Minerva endocrinologica* 2004, **29**(4):241-275.
179. Ben-Jonathan N, Hnasko R: **Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor.** *Endocrine reviews* 2001, **22**(6):724-763.
180. Reichlin S: **Neuroendocrinology of the pituitary gland.** *Toxicologic pathology* 1989, **17**(2):250-255.
181. Juorio AV, Li XM, Walz W, Paterson IA: **Decarboxylation of L-dopa by cultured mouse astrocytes.** *Brain research* 1993, **626**(1-2):306-309.
182. Li XM, Juorio AV, Paterson IA, Walz W, Zhu MY, Boulton AA: **Gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in cultured rat glial cells.** *Journal of neurochemistry* 1992, **59**(3):1172-1175.
183. Bowsher RR, Henry DP: **Decarboxylation of p-tyrosine: a potential source of p-tyramine in mammalian tissues.** *Journal of neurochemistry* 1983, **40**(4):992-1002.
184. Juorio AV, Paterson IA: **Tryptamine may couple dopaminergic and serotonergic transmission in the brain.** *General Pharmacology: The Vascular System* 1990, **21**(5):613-616.
185. Paterson IA, Juorio AV, Boulton AA: **2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system?** *Journal of neurochemistry* 1990, **55**(6):1827-1837.
186. Lindstrom PER, Sehlin J: **Mechanisms Underlying the Effects of 5-Hydroxytryptamine and 5-Hydroxytryptophan in Pancreatic Islets. A Proposed Role for L-Aromatic Amino Acid Decarboxylase*.** *Endocrinology* 1983, **112**(4):1524-1529.
187. Eisenhofer G, Aneman A, Friberg P, Hooper D, Fandriks L, Lonroth H, Hunyady B, Mezey E: **Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997, **82**(11):3864-3871.
188. Bertorello A, Hokfelt T, Goldstein M, Aperia A: **Proximal tubule Na⁺-K⁺-ATPase activity is inhibited during high-salt diet: evidence for DA-mediated effect.** *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 1988, **254**(6):F795.
189. Baylin SB, Abeloff MD, Goodwin G, Carney DN, Gazdar AF: **Activities of L-dopa decarboxylase and diamine oxidase (histaminase) in human lung cancers and decarboxylase as a marker for small (oat) cell cancer in cell culture.** *Cancer research* 1980, **40**(6):1990-1994.
190. Pearse AG: **The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic**

- implications of the concept.** *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1969, **17**(5):303-313.
191. Lauweryns JM, de Bock V, Verhofstad AA, Steinbusch HW: **Immunohistochemical localization of serotonin in intrapulmonary neuro-epithelial bodies.** *Cell and tissue research* 1982, **226**(1):215-223.
 192. Dockray GJ, Varro A, Dimaline R: **Gastric endocrine cells: gene expression, processing, and targeting of active products.** *Physiological reviews* 1996, **76**(3):767-798.
 193. Aguanno A, Afar R, Albert VR: **Tissue-specific expression of the nonneuronal promoter of the aromatic L-amino acid decarboxylase gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 1.** *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(8):4528-4538.
 194. Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, Saruta T: **Aromatic L-amino acid decarboxylase activity along the rat nephron.** *The American journal of physiology* 1990, **258**(1 Pt 2):F28-33.
 195. Isaac J, Berndt TJ, Chinnow SL, Tyce GM, Dousa TP, Knox FG: **Dopamine enhances the phosphaturic response to parathyroid hormone in phosphate-deprived rats.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1992, **2**(9):1423-1429.
 196. Bertorello A, Hokfelt T, Goldstein M, Aperia A: **Proximal tubule Na⁺-K⁺-ATPase activity is inhibited during high-salt diet: evidence for DA-mediated effect.** *The American journal of physiology* 1988, **254**(6 Pt 2):F795-801.
 197. Lee WY, Chang JW, Nemeth NL, Kang UJ: **Vesicular monoamine transporter-2 and aromatic L-amino acid decarboxylase enhance dopamine delivery after L-3, 4-dihydroxyphenylalanine administration in Parkinsonian rats.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999, **19**(8):3266-3274.
 198. Khundmiri SJ, Lederer E: **PTH and DA regulate Na-K ATPase through divergent pathways.** *American journal of physiology Renal physiology* 2002, **282**(3):F512-522.
 199. Mezey E, Eisenhofer G, Harta G, Hansson S, Gould L, Hunyady B, Hoffman BJ: **A novel nonneuronal catecholaminergic system: exocrine pancreas synthesizes and releases dopamine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(19):10377-10382.
 200. Boomsma F, Ausema L, Hakvoort-Cammel FG, Oosterom R, Man in't Veld AJ, Krenning EP, Hahlen K, Schalekamp MA: **Combined measurements of plasma aromatic L-amino acid decarboxylase and DOPA as tumour markers in diagnosis and follow-up of neuroblastoma.** *European journal of cancer & clinical oncology* 1989, **25**(7):1045-1052.
 201. Rahman MK, Nagatsu T, Kato T: **Determination of aromatic L-amino acid decarboxylase in serum of various animals by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.** *Life sciences* 1981, **28**(5):485-492.
 202. Noth RH, Mulrow PJ: **Serum dopamine beta-hydroxylase as an index of sympathetic nervous system activity in man.** *Circulation research* 1976, **38**(1):1-5.
 203. Sims KL, Davis GA, Bloom FE: **Activities of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan decarboxylases in rat brain: assay characteristics and distribution.** *Journal of neurochemistry* 1973, **20**(2):449-464.

204. Gardner CR, Richards MH: **Use of D,L-alpha-monofluoromethyl-dopa to distinguish subcellular pools of aromatic amino acid decarboxylase in mouse brain.** *Brain research* 1981, **216**(2):291-298.
205. Poulidakos P, Vassilacopoulou D, Fragoulis EG: **L-DOPA decarboxylase association with membranes in mouse brain.** *Neurochemical research* 2001, **26**(5):479-485.
206. Poulidakos P, D V, E.G F: **A membrane-associated form of L-DOPA decarboxylase in the white prepuparium and adult eclosion developmental stages of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, vol. 17; 2002.**
207. Nagatsu T: **Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology.** *Essays in biochemistry* 1995, **30**:15-35.
208. Kuczenski RT, Mandell AJ: **Regulatory properties of soluble and particulate rat brain tyrosine hydroxylase.** *The Journal of biological chemistry* 1972, **247**(10):3114-3122.
209. Morita K, Teraoka K, Oka M: **Interaction of cytoplasmic tyrosine hydroxylase with chromaffin granule. In vitro studies on association of soluble enzyme with granule membranes and alteration in enzyme activity.** *The Journal of biological chemistry* 1987, **262**(12):5654-5658.
210. Berry MD, Juorio AV, Li XM, Boulton AA: **Aromatic L-amino acid decarboxylase: a neglected and misunderstood enzyme.** *Neurochemical research* 1996, **21**(9):1075-1087.
211. Kang UJ, Lee WY, Chang JW: **Gene therapy for Parkinson's disease: determining the genes necessary for optimal dopamine replacement in rat models.** *Human cell* 2001, **14**(1):39-48.
212. Lee WY, Chang JW, Nemeth NL, Kang UJ: **Vesicular Monoamine Transporter-2 and Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Enhance Dopamine Delivery after 3,4-Dihydroxyphenylalanine Administration in Parkinsonian Rats.** *The Journal of Neuroscience* 1999, **19**(8):3266.
213. Poewe W, Antonini A: **Novel formulations and modes of delivery of levodopa.** *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2015, **30**(1):114-120.
214. Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT, Jr.: **Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct.** *Science* 2001, **294**(5545):1346-1349.
215. Witt J, Marks WJ, Jr.: **An update on gene therapy in Parkinson's disease.** *Current neurology and neuroscience reports* 2011, **11**(4):362-370.
216. Leff SE, Spratt SK, Snyder RO, Mandel RJ: **Long-term restoration of striatal L-aromatic amino acid decarboxylase activity using recombinant adeno-associated viral vector gene transfer in a rodent model of Parkinson's disease.** *Neuroscience* 1999, **92**(1):185-196.
217. Kow RL, Sikkema C, Wheeler JM, Wilkinson CW, Kraemer BC: **Dopa Decarboxylase Modulates Tau Toxicity.** *Biological psychiatry* 2017.
218. Chiba S, Takada E, Tadokoro M, Taniguchi T, Kadoyama K, Takenokuchi M, Kato S, Suzuki N: **Loss of dopaminoreceptive neuron causes L-dopa resistant parkinsonism in tauopathy.** *Neurobiology of aging* 2012, **33**(10):2491-2505.
219. Wu TH, Lu YN, Chuang CL, Wu CL, Chiang AS, Krantz DE, Chang HY: **Loss of vesicular dopamine release precedes tauopathy in degenerative dopaminergic**

- neurons in a Drosophila model expressing human tau.** *Acta neuropathologica* 2013, **125**(5):711-725.
220. McCormick AV, Wheeler JM, Guthrie CR, Liachko NF, Kraemer BC: **Dopamine D2 Receptor Antagonism Suppresses Tau Aggregation and Neurotoxicity.** *Biological psychiatry*, **73**(5):464-471.
 221. Lebel M, Patenaude C, Allyson J, Massicotte G, Cyr M: **Dopamine D1 receptor activation induces tau phosphorylation via cdk5 and GSK3 signaling pathways.** *Neuropharmacology* 2009, **57**(4):392-402.
 222. Rangel-Barajas C, Coronel I, Floran B: **Dopamine Receptors and Neurodegeneration.** *Aging and disease* 2015, **6**(5):349-368.
 223. Martorana A, Koch G: **“Is dopamine involved in Alzheimer's disease?”.** *Frontiers in Aging Neuroscience* 2014, **6**.
 224. Gille G, Riederer P: **Dopamine and Neurodegeneration.** In: *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders*. Edited by Schmidt WJ, Reith MEA. Totowa, NJ: Humana Press; 2005: 415-445.
 225. Li J, Zhu M, Manning-Bog AB, Di Monte DA, Fink AL: **Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004, **18**(9):962-964.
 226. Halliwell B: **Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life.** *Plant Physiology* 2006, **141**(2):312-322.
 227. Rosenberg PA: **Catecholamine toxicity in cerebral cortex in dissociated cell culture.** *The Journal of Neuroscience* 1988, **8**(8):2887.
 228. Tanaka M, Sotomatsu A, Kanai H, Hirai S: **Dopa and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron.** *Journal of the Neurological Sciences* 1991, **101**(2):198-203.
 229. Hoyt KR, Reynolds IJ, Hastings TG: **Mechanisms of Dopamine-Induced Cell Death in Cultured Rat Forebrain Neurons: Interactions with and Differences from Glutamate-Induced Cell Death.** *Experimental Neurology* 1997, **143**(2):269-281.
 230. Westlund KN, Denney RM, Rose RM, Abell CW: **Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem.** *Neuroscience* 1988, **25**(2):439-456.
 231. Levitt P, Pintar JE, Breakefield XO: **Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982, **79**(20):6385-6389.
 232. Rosei MA, Blarzino C, Foppoli C, Mosca L, Coccia R: **Lipoxygenase-catalyzed oxidation of catecholamines.** *Biochemical and biophysical research communications* 1994, **200**(1):344-350.
 233. Foppoli C, Coccia R, Cini C, Rosei MA: **Catecholamines oxidation by xanthine oxidase.** *Biochimica et biophysica acta* 1997, **1334**(2-3):200-206.
 234. Mattammal MB, Strong R, Lakshmi VM, Chung HD, Stephenson AH: **Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease.** *Journal of neurochemistry* 1995, **64**(4):1645-1654.

235. Bindoli A, Rigobello MP, Deeble DJ: **Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines.** *Free radical biology & medicine* 1992, **13**(4):391-405.
236. Graham DG: **On the origin and significance of neuromelanin.** *Archives of pathology & laboratory medicine* 1979, **103**(7):359-362.
237. Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB: **Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains.** *Journal of neurochemistry* 1989, **52**(2):515-520.
238. Dexter DT, Wells FR, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD: **Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain.** *Lancet (London, England)* 1987, **2**(8569):1219-1220.
239. LaVoie MJ, Hastings TG: **Peroxynitrite- and nitrite-induced oxidation of dopamine: implications for nitric oxide in dopaminergic cell loss.** *Journal of neurochemistry* 1999, **73**(6):2546-2554.
240. Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE: **Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases.** *Progress in neurobiology* 2000, **60**(5):409-470.
241. Beal MF: **Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases.** *Annals of neurology* 1995, **38**(3):357-366.
242. Zündorf G, Reiser G: **Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection.** *Antioxidants & redox signaling* 2011, **14**(7):1275-1288.
243. Weingarten P, Bermak J, Zhou QY: **Evidence for non-oxidative dopamine cytotoxicity: potent activation of NF-kappa B and lack of protection by anti-oxidants.** *Journal of neurochemistry* 2001, **76**(6):1794-1804.
244. Shih JC, Chen K, Ridd MJ: **Monoamine oxidase: from genes to behavior.** *Annual review of neuroscience* 1999, **22**:197-217.
245. Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Jr., Gutknecht WF: **Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro.** *Molecular pharmacology* 1978, **14**(4):644-653.
246. Sidhu A, Wersinger C, Vernier P: **alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease.** *FEBS letters* 2004, **565**(1-3):1-5.
247. Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G: **Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates.** *Journal of neurochemistry* 1981, **36**(2):589-593.
248. Youdim MB: **What have we learnt from CDNA microarray gene expression studies about the role of iron in MPTP induced neurodegeneration and Parkinson's disease?** *Journal of neural transmission Supplementum* 2003(65):73-88.
249. Yu S, Ueda K, Chan P: **Alpha-synuclein and dopamine metabolism.** *Molecular neurobiology* 2005, **31**(1-3):243-254.
250. Takeda A, Tomita Y, Okinaga S, Tagami H, Shibahara S: **Functional analysis of the cDNA encoding human tyrosinase precursor.** *Biochemical and biophysical research communications* 1989, **162**(3):984-990.

251. Hasegawa T, Matsuzaki M, Takeda A, Kikuchi A, Furukawa K, Shibahara S, Itoyama Y: **Increased dopamine and its metabolites in SH-SY5Y neuroblastoma cells that express tyrosinase.** *Journal of neurochemistry* 2003, **87**(2):470-475.
252. Hasegawa T, Matsuzaki-Kobayashi M, Takeda A, Sugeno N, Kikuchi A, Furukawa K, Perry G, Smith MA, Itoyama Y: **Alpha-synuclein facilitates the toxicity of oxidized catechol metabolites: implications for selective neurodegeneration in Parkinson's disease.** *FEBS letters* 2006, **580**(8):2147-2152.
253. Gluck MR, Zeevalk GD: **Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: implications for Parkinson's disease and catecholamine-associated diseases.** *Journal of neurochemistry* 2004, **91**(4):788-795.
254. Gao N, Li YH, Li X, Yu S, Fu GL, Chen B: **Effect of alpha-synuclein on the promoter activity of tyrosine hydroxylase gene.** *Neuroscience bulletin* 2007, **23**(1):53-57.
255. Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, Berg D, Mueller JC, Gasser T: **Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008, **22**(5):1327-1334.
256. Peng X, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG: **Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells.** *Journal of cell science* 2005, **118**(Pt 15):3523-3530.
257. Liu D, Jin L, Wang H, Zhao H, Zhao C, Duan C, Lu L, Wu B, Yu S, Chan P *et al*: **Silencing alpha-synuclein gene expression enhances tyrosine hydroxylase activity in MN9D cells.** *Neurochemical research* 2008, **33**(7):1401-1409.
258. Tehranian R, Montoya SE, Van Laar AD, Hastings TG, Perez RG: **Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells.** *Journal of neurochemistry* 2006, **99**(4):1188-1196.
259. Wersinger C, Sidhu A: **Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein.** *Neuroscience letters* 2003, **340**(3):189-192.
260. Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL, Wade-Martins R: **alpha-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease.** *Trends in neurosciences* 2010, **33**(12):559-568.
261. Fountaine TM, Wade-Martins R: **RNA interference-mediated knockdown of alpha-synuclein protects human dopaminergic neuroblastoma cells from MPP(+) toxicity and reduces dopamine transport.** *Journal of neuroscience research* 2007, **85**(2):351-363.
262. Yavich L, Tanila H, Vepsalainen S, Jakala P: **Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004, **24**(49):11165-11170.
263. Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T *et al*: **High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease.** *Nature genetics* 2006, **38**(5):515-517.
264. Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K: **Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons.** *Nature genetics* 2006, **38**(5):518-520.
265. Uhl GR: **Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease.** *Annals of neurology* 1998, **43**(5):555-560.

266. Miller GW, Gainetdinov RR, Levey AI, Caron MG: **Dopamine transporters and neuronal injury.** *Trends in pharmacological sciences* 1999, **20**(10):424-429.
267. Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D: **Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons.** *Neuron* 2009, **62**(2):218-229.
268. Lopez OL, Wisniewski SR, Becker JT, Boileau F, DeKosky ST: **Extrapyramidal signs in patients with probable Alzheimer disease.** *Archives of neurology* 1997, **54**(8):969-975.
269. Portet F: **Extrapyramidal signs before and after the diagnosis of incident Alzheimer disease in a prospective population study.** 2009, **66**(9):1120-1126.
270. Trillo L, Das D, Hsieh W, Medina B, Moghadam S, Lin B, Dang V, Sanchez MM, De Miguel Z, Ashford JW *et al*: **Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. translating basic science into clinical care.** *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2013, **37**(8):1363-1379.
271. Backman L, Lindenberger U, Li SC, Nyberg L: **Linking cognitive aging to alterations in dopamine neurotransmitter functioning: recent data and future avenues.** *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2010, **34**(5):670-677.
272. Robert PH, Mulin E, Mallea P, David R: **REVIEW: Apathy diagnosis, assessment, and treatment in Alzheimer's disease.** *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2010, **16**(5):263-271.
273. Perez SE, Lazarov O, Koprach JB, Chen EY, Rodriguez-Menendez V, Lipton JW, Sisodia SS, Mufson EJ: **Nigrostriatal dysfunction in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mice.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2005, **25**(44):10220-10229.
274. Ambree O, Richter H, Sachser N, Lewejohann L, Dere E, de Souza Silva MA, Herring A, Keyvani K, Paulus W, Schabitz WR: **Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease.** *Neurobiology of aging* 2009, **30**(8):1192-1204.
275. Himeno E, Ohyagi Y, Ma L, Nakamura N, Miyoshi K, Sakae N, Motomura K, Soejima N, Yamasaki R, Hashimoto T *et al*: **Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid-beta degradation.** *Annals of neurology* 2011, **69**(2):248-256.
276. Kemppainen N, Laine M, Laakso MP, Kaasinen V, Nagren K, Vahlberg T, Kurki T, Rinne JO: **Hippocampal dopamine D2 receptors correlate with memory functions in Alzheimer's disease.** *The European journal of neuroscience* 2003, **18**(1):149-154.
277. Kumar U, Patel SC: **Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer's disease brain.** *Brain research* 2007, **1131**(1):187-196.
278. Rinne JO, Sako E, Paljarvi L, Molsa PK, Rinne UK: **Brain dopamine D-2 receptors in senile dementia.** *Journal of neural transmission* 1986, **65**(1):51-62.
279. Allard P, Alafuzoff I, Carlsson A, Eriksson K, Ericson E, Gottfries CG, Marcusson JO: **Loss of dopamine uptake sites labeled with [3H]GBR-12935 in Alzheimer's disease.** *European neurology* 1990, **30**(4):181-185.
280. Murray AM, Weihmueller FB, Marshall JF, Hurtig HI, Gottlieb GL, Joyce JN: **Damage to dopamine systems differs between Parkinson's disease and Alzheimer's disease with parkinsonism.** *Annals of neurology* 1995, **37**(3):300-312.

281. Joyce JN, Smutzer G, Whitty CJ, Myers A, Bannon MJ: **Differential modification of dopamine transporter and tyrosine hydroxylase mRNAs in midbrain of subjects with Parkinson's, Alzheimer's with parkinsonism, and Alzheimer's disease.** *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 1997, **12**(6):885-897.
282. Pievani M, Bocchetta M, Boccardi M, Cavado E, Bonetti M, Thompson PM, Frisoni GB: **Striatal morphology in early-onset and late-onset Alzheimer's disease: a preliminary study.** *Neurobiology of aging* 2013, **34**(7):1728-1739.
283. Martorana A, Mori F, Esposito Z, Kusayanagi H, Monteleone F, Codeca C, Sancesario G, Bernardi G, Koch G: **Dopamine modulates cholinergic cortical excitability in Alzheimer's disease patients.** *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2009, **34**(10):2323-2328.
284. Koch G, Di Lorenzo F, Bonni S, Giacobbe V, Bozzali M, Caltagirone C, Martorana A: **Dopaminergic modulation of cortical plasticity in Alzheimer's disease patients.** *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2014, **39**(11):2654-2661.
285. Palop JJ, Mucke L: **Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks.** *Nature neuroscience* 2010, **13**(7):812-818.
286. Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT: **Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease.** *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 2004, **29**(6):427-441.
287. Ferrer I: **Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia.** *Progress in neurobiology* 2012, **97**(1):38-51.
288. Schliebs R, Arendt T: **The cholinergic system in aging and neuronal degeneration.** *Behavioural brain research* 2011, **221**(2):555-563.
289. Ni R, Marutle A, Nordberg A: **Modulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid-beta interactions in Alzheimer's disease brain.** *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2013, **33**(3):841-851.
290. Alkondon M, Albuquerque EX: **A non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptor modulates excitatory input to hippocampal CA1 interneurons.** *Journal of neurophysiology* 2002, **87**(3):1651-1654.
291. Posadas I, Lopez-Hernandez B, Cena V: **Nicotinic receptors in neurodegeneration.** *Current neuropharmacology* 2013, **11**(3):298-314.
292. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O: **Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008, **28**(53):14537-14545.
293. Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB: **beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(8):5626-5632.
294. Iqbal K, Flory M, Soininen H: **Clinical symptoms and symptom signatures of Alzheimer's disease subgroups.** *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2013, **37**(3):475-481.

295. Nobili A, Latagliata EC, Viscomi MT, Cavallucci V, Cutuli D, Giacobuzzo G, Krashia P, Rizzo FR, Marino R, Federici M *et al*: **Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease.** *Nature Communications* 2017, **8**:14727.
296. D'Amelio M, Nistico R: **Unlocking the secrets of dopamine in Alzheimer's Disease.** *Pharmacological research* 2017.
297. Iqbal K, Alonso AD, Gondal JA, Gong CX, Haque N, Khatoon S, Sengupta A, Wang JZ, Grundke-Iqbal I: **Mechanism of neurofibrillary degeneration and pharmacologic therapeutic approach.** *Journal of neural transmission Supplementum* 2000, **59**:213-222.
298. Mitchell RA, Herrmann N, Lanctot KL: **The role of dopamine in symptoms and treatment of apathy in Alzheimer's disease.** *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2011, **17**(5):411-427.
299. Xie A, Gao J, Xu L, Meng D: **Shared mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease and Parkinson's disease.** *BioMed research international* 2014, **2014**:648740.
300. Hamilton RL: **Lewy Bodies in Alzheimer's Disease: A Neuropathological Review of 145 Cases Using α -Synuclein Immunohistochemistry.** *Brain Pathology* 2000, **10**(3):378-384.
301. Kim S, Seo J-H, Suh Y-H: **α -Synuclein, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease.** *Parkinsonism & related disorders*, **10**:S9-S13.
302. Desikan RS, Schork AJ, Wang Y, Witoelar A, Sharma M, McEvoy LK, Holland D, Brewer JB, Chen CH, Thompson WK *et al*: **Genetic overlap between Alzheimer's disease and Parkinson's disease at the MAPT locus.** 2015, **20**(12):1588-1595.
303. Liu G, Bao X, Jiang Y, Liao M, Jiang Q, Feng R, Zhang L, Ma G, Chen Z, Wang G *et al*: **Identifying the Association Between Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Using Genome-Wide Association Studies and Protein-Protein Interaction Network.** *Molecular neurobiology* 2015, **52**(3):1629-1636.
304. Kim YH, Beak SH, Charidimou A, Song M: **Discovering New Genes in the Pathways of Common Sporadic Neurodegenerative Diseases: A Bioinformatics Approach.** *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2016, **51**(1):293-312.
305. Calderone A, Formenti M, Aprea F, Papa M, Alberghina L, Colangelo AM, Bertolazzi P: **Comparing Alzheimer's and Parkinson's diseases networks using graph communities structure.** *BMC Systems Biology* 2016, **10**(1):25.
306. Calderone A, Formenti M, Aprea F, Papa M, Alberghina L, Colangelo AM, Bertolazzi P: **Comparing Alzheimer's and Parkinson's diseases networks using graph communities structure.** *BMC Syst Biol* 2016, **10**.
307. Gitler AD, Dhillon P, Shorter J: **Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope.** *Disease Models & Mechanisms* 2017, **10**(5):499.
308. Jin CM, Yang YJ, Huang HS, Lim SC, Kai M, Lee MK: **Induction of dopamine biosynthesis by L-DOPA in PC12 cells: implications of L-DOPA influx and cyclic AMP.** *European journal of pharmacology* 2008, **591**(1-3):88-95.
309. Di Scala C, Yahi N, Boutemour S, Flores A, Rodriguez L, Chahinian H, Fantini J: **Common molecular mechanism of amyloid pore formation by Alzheimer's beta-amyloid peptide and alpha-synuclein.** *Scientific reports* 2016, **6**:28781.
310. Lahiri DK: **The stability of beta-amyloid precursor protein in nine different cell types.** *Biochemistry and molecular biology international* 1993, **29**(5):849-858.

311. Bergstrom P, Agholme L, Nazir FH, Satir TM, Toombs J, Wellington H, Strandberg J, Bontell TO, Kvartsberg H, Holmstrom M *et al*: **Amyloid precursor protein expression and processing are differentially regulated during cortical neuron differentiation.** *Scientific reports* 2016, **6**:29200.
312. Vassilacopoulou D, Ripellino JA, Tezapsidis N, Hook VY, Robakis NK: **Full-length and truncated Alzheimer amyloid precursors in chromaffin granules: solubilization of membrane amyloid precursor is mediated by an enzymatic mechanism.** *Journal of neurochemistry* 1995, **64**(5):2140-2146.
313. Arai H, Lee VM, Messinger ML, Greenberg BD, Lowery DE, Trojanowski JQ: **Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects.** *Annals of neurology* 1991, **30**(5):686-693.
314. Isbert S, Wagner K, Eggert S, Schweitzer A, Multhaup G, Weggen S, Kins S, Pietrzik CU: **APP dimer formation is initiated in the endoplasmic reticulum and differs between APP isoforms.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2012, **69**(8):1353-1375.
315. Scheuermann S, Hambsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Beher D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G: **Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(36):33923-33929.
316. Kaden D, Voigt P, Munter LM, Bobowski KD, Schaefer M, Multhaup G: **Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2.** *Journal of cell science* 2009, **122**(Pt 3):368-377.
317. Friedman LM, Matsuda Y, Lazarovici P: **The microbial alkaloid toxin staurosporine blocks the phorbol ester-induced increase in beta-amyloid precursor protein in PC12 cells.** *Natural toxins* 1997, **5**(5):173-179.
318. Kwak YD, Choumkina E, Sugaya K: **Amyloid precursor protein is involved in staurosporine induced glial differentiation of neural progenitor cells.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **344**(1):431-437.
319. Nivsarkar M, Banerjee A: **Establishing the probable mechanism of L-DOPA in Alzheimer's disease management.** *Acta poloniae pharmaceutica* 2009, **66**(5):483-486.